



INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS NA MORFOLOGIA DE
SUPORTES ENZIMÁTICOS PREPARADOS POR POLIMERIZAÇÃO EM
SUSPENSÃO-EMULSÃO

Martina Costa Cerqueira Pinto

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

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto
Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro

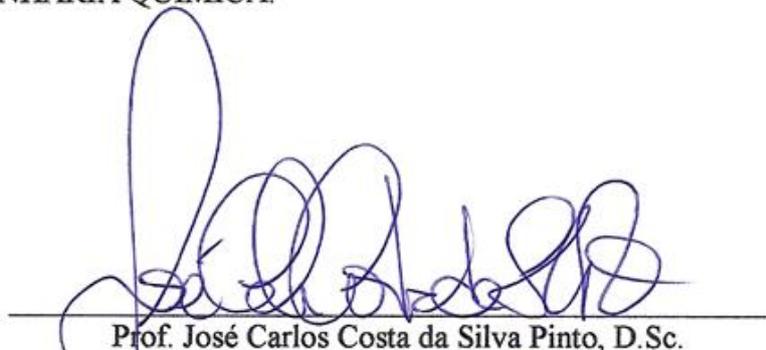
Março de 2013

INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS NA MORFOLOGIA DE
SUPORTES ENZIMÁTICOS PREPARADOS POR POLIMERIZAÇÃO EM
SUSPENSÃO-EMULSÃO

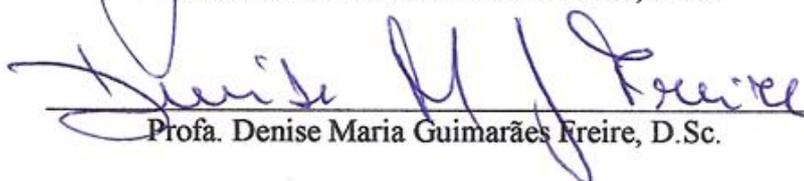
Martina Costa Cerqueira Pinto

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

Examinada por:



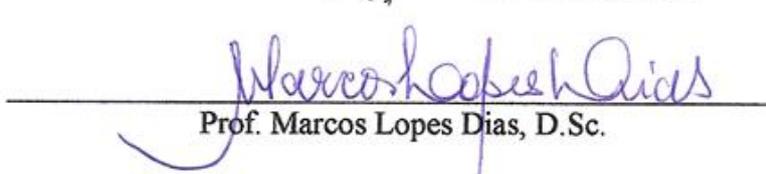
Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.



Profa. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.



Profa. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.



Prof. Marcos Lopes Dias, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

MARÇO DE 2013

Pinto, Martina Costa Cerqueira

Influência de Variáveis Operacionais na Morfologia de Suportes Enzimáticos Preparados por Polimerização em Suspensão-Emulsão/ Martina Costa Cerqueira Pinto. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2013.

XX, 190 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Dissertação (mestrado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2013.

Referências Bibliográficas: p. 173-190.

1. Polimerização simultânea em suspensão-emulsão. 2. Morfologia. 3. Suportes enzimáticos. I. Pinto, José Carlos Costa da Silva *et al.* II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Programa de Engenharia Química. III. Título.

*“Quando voa o condor
Com o céu por detrás
Traz na asa um sonho
Com o céu por detrás
Voa condor
Que a gente voa atrás
Voa atrás do sonho
Com o céu por detrás”
(Oswaldo Montenegro)*

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Márcia e José Carlos, que são as luzes da minha vida. Sempre me apoiaram, me deram força, incentivo, muito colo nos momentos mais difíceis e, principalmente, me deram o exemplo para ser quem sou hoje. Obrigada por vocês fazerem parte da minha vida de forma tão presente.

A meu namorado, Frederico, que esteve e está sempre ao meu lado, compreendendo meus muitos momentos de impaciência e irritação e retribuindo sempre com apoio, atenção e carinho.

A meus irmãos, Monzico e Juninho, pelo carinho, pelo incentivo e pelos muitos sorrisos e gargalhadas, que deram mais colorido às várias horas de estudo e trabalho.

A minha família, por todo apoio e toda a força.

A meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, dando-me muito incentivo, carinho, apoio, momentos de leveza e alegria.

A meu orientador José Carlos, pelo apoio, por ter compartilhado todo seu conhecimento, sua experiência e seu enorme carinho.

A minha orientadora Denise, pelo carinho, pela confiança depositada, pela paciência, por toda a contribuição ao longo do trabalho.

A meus amigos do LMSCP: Debbie, Anitcha, Dirceuzitcho, Rodrigo, Luizão, Larissa, Rhana, Thamyres, Marina, Carlos, Aline, Jorge, Paulinha, Leilane, Grazi, Ricardo, Israel, Rafael, Cecília, Simoni, Bruno Bahia, Luiza baiana por todo o carinho, pelos muitos momentos de risadas e descontração que fizeram das idas ao LMSCP sempre um momento de extremo prazer e alegria. Vocês fizeram, sem dúvida, toda a diferença.

Aos amigos do LADEQ: Natasha, Rosana, Carla e Luciene por sempre nos ajudarem de forma tão solícita e sempre com um sorriso no rosto.

Aos amigos do LABIM: Jack 1, Jack 2, Joab, Elisa, Antônio, Douglas, Fábio, por toda ajuda e colaboração. Um agradecimento especial a Val, a Aline e a Érica pela ajuda e, principalmente, pelo carinho.

Um agradecimento igualmente especial a Jacira e à equipe da UERJ pelas análises de BET, equipe sem a qual esse trabalho tornar-se-ia ainda mais complicado. A Leila, do Nucat/UFRJ, também pelas análises de BET. A Mariana Paixão e a Taís pela ajuda nas análises de microscopia eletrônica de varredura.

Aos amigos feitos ao longo do mestrado, principalmente a Anderson, João, Luiz, Thainá, Carla, Camila, Bruno, Fernanda, Tafarel que foram responsáveis pela maior parte dos momentos especiais ao longo desse período, principalmente na fase das disciplinas.

Ao CNPq, à CAPES e à FAPERJ pelo auxílio financeiro.

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

INFLUÊNCIA DE VARIÁVEIS OPERACIONAIS NA MORFOLOGIA DE
SUPORTES ENZIMÁTICOS PREPARADOS POR POLIMERIZAÇÃO EM
SUSPENSÃO-EMULSÃO

Martina Costa Cerqueira Pinto

Março/2013

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Programa: Engenharia Química

Novas partículas poliméricas foram sintetizadas com auxílio da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. O foco principal do trabalho foi a síntese de partículas casca-núcleo de poliestireno e o estudo sobre como as condições reacionais afetam a morfologia das partículas, procurando entender como a porosidade e a área específica dependem da concentração de iniciador, concentração de surfactante, vazão de alimentação e quantidade de monômero alimentada. Além disso, foi avaliado o emprego das partículas como suporte nos processos de imobilização da lipase B de *Candida antarctica*, mostrando-se como a morfologia das partículas afeta os parâmetros de imobilização. Observou-se que todas as variáveis operacionais afetam a morfologia dessas partículas. Percebeu-se, mais especificamente, que o aumento da área específica está atrelado principalmente ao aumento da quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo e não à morfologia das partículas emulsificadas. Modelos também foram desenvolvidos para descrever as atividades dos biocatalisadores produzidos como função da morfologia dos suportes empregados e das variáveis operacionais envolvidas na etapa de polimerização.

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

INFLUENCE OF OPERATING VARIABLES ON THE MORPHOLOGY OF
ENZYME SUPPORTS PREPARED BY SUSPENSION-EMULSION
POLYMERIZATION

Martina Costa Cerqueira Pinto

March/2013

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Department: Chemical Engineering

Polymer particles were synthesized by suspension-emulsion polymerization. The main objective of the present work was to understand how the operation conditions affect the final particle morphology made from polystyrene, focusing on how porosity and specific area depend on initiator concentration, surfactant concentration, feeding flow rate and monomer load. Produced particles were employed as supports in lipase B from *Candida antarctica* immobilization processes, in order to comprehend how the morphology of the produced particles affects the immobilization parameters. It was observed that all operating variables influence the particles morphology, but it was noticed that the increase of the specific area depends mainly on the increase of the amount of particles deposited on the shell and not on the morphology of the emulsified particles. Finally, empirical models were developed to describe the performance of the biocatalysts as a function of the support morphology and the operating variables.

Índice

Capítulo 1. Introdução	1
1.1. Introdução	1
1.2. Objetivo da Dissertação	3
1.2.1. Objetivo Geral	3
1.2.2. Objetivo Específico	3
1.3. Estrutura da Tese	4
Capítulo 2. Revisão Bibliográfica	6
2.1. Mecanismos dos Processos de Polimerização	6
2.1.1. Polimerização em Cadeia via Radicais Livres	7
2.1.2. Processos de Polimerização em Suspensão	9
2.1.2.1. Tipos de Processo de Polimerização em Suspensão	10
2.1.2.2. Iniciadores	12
2.1.2.3. Efeitos Gel e Vítreo	13
2.1.2.4. Fatores Influentes na Distribuição de Tamanhos de Partícula	13
2.1.3. Processos de Polimerização em Emulsão	15
2.1.3.1. Tipos de Processo de Polimerização em Emulsão	18
2.1.3.2. Iniciadores	20
2.1.3.3. Surfactantes	21
2.1.3.4. Fatores Influentes na Distribuição de Tamanhos de Partícula	21
2.1.4. Processos de Síntese de Partículas Poliméricas com Estrutura Casca-Núcleo	22
2.1.5. Partículas Casca-Núcleo Sintetizadas a partir da Polimerização em Suspensão e Emulsão Simultâneas	26
2.2. Imobilização Enzimática	30
2.2.1. Métodos de Imobilização Enzimática	32
2.2.2. Efeitos da Imobilização na Cinética e Estabilidade das Enzimas Imobilizadas	34
2.2.3. Suportes Empregados na Imobilização Enzimática	37

2.2.3.1. Suportes Poliméricos Empregados na Imobilização Enzimática	40
2.2.3.2. Suportes Poliméricos Sintetizados a partir do Processo em Suspensão-Emulsão Empregados na Imobilização Enzimática .	45
2.3. Comentários Finais	46
Capítulo 3. Materiais e Metodologias	48
3.1. Etapa de Polimerização em Suspensão-Emulsão Simultâneas	48
3.1.1. Materiais	48
3.1.2. Metodologia	51
3.1.2.1. Etapa da Polimerização em Suspensão	52
3.1.2.2. Etapa da Polimerização em Suspensão-Emulsão Simultâneas	53
3.1.3. Caracterização das Partículas Poliméricas	55
3.1.2.1. Microscopia Óptica	56
3.1.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura	56
3.1.2.3. Cromatografia de Permeação em Gel	56
3.1.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	58
3.1.2.5. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro, Volume Específico de Poros	58
3.1.2.6. Distribuição de Tamanhos de Partícula	60
3.1.2.7. Determinação da Conversão, do Rendimento da Reação e do Teor de Sólidos	61
3.2. Etapa de Imobilização Enzimática	62
3.2.1. Materiais	62
3.2.2. Metodologia	66
3.2.3. Avaliação do Desempenho dos Biocatalisadores Produzidos	67
3.2.3.1. Cinética de Imobilização Baseada na Atividade Hidrolítica	68
3.2.3.2. Atividade de Hidrólise do Biocatalisador	69
3.2.3.3. Atividade de Esterificação da Enzima Imobilizada	71
3.2.3.4. Cinética de Imobilização Baseada na Quantidade de Proteína	72
3.3. Análise Estatística	73

Capítulo 4. Resultados e Discussão	75
4.1. Primeiro Bloco Experimental	75
4.1.1. Influência de Variáveis Operacionais nas Propriedades das Partículas Poliméricas	76
4.1.1.1. Distribuições de Massas Molares	82
4.1.1.2. Temperaturas de Transição Vítrea	86
4.1.1.3. Morfologia das Partículas Poliméricas	87
4.1.1.3.1. Distribuição de Tamanhos de Partícula	90
4.1.1.3.2. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro e Volume Específico de Poros	95
4.1.2. Avaliação dos Parâmetros de Imobilização	105
4.1.3. Modelagem	117
4.2. Segundo Bloco Experimental	122
4.2.1. Influência da Massa de Monômero Alimentada nas Partículas Poliméricas	123
4.2.1.1. Distribuições de Massas Molares	125
4.2.1.2. Temperaturas de Transição Vítrea	129
4.2.1.3. Morfologia das Partículas Poliméricas	130
4.2.1.3.1. Distribuição de Tamanhos de Partícula	132
4.2.1.3.2. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro e Volume Específico de Poros	136
4.2.2. Avaliação dos Parâmetros de Imobilização	139
4.2.3. Validação dos Modelos Propostos	148
4.3. Proposição de um Modelo Físico	157
 Capítulo 5. Conclusões e Sugestões	 158
5.1. Sugestões	160
 Apêndice A	 161
 Apêndice B	 164
 Referências Bibliográficas	 173

Lista de Figuras

Figura 2.1. Polímero com estrutura casca-núcleo	27
Figura 2.2. Mecanismo de formação das partículas com morfologia casca-núcleo	29
Figura 2.3. Mecanismo de adsorção da lipase a suportes hidrofóbicos	36
Figura 2.4. Fatores responsáveis pelo desempenho do biocatalisador	38
Figura 3.1. Unidade experimental utilizada para produção das partículas com morfologia casca-núcleo	49
Figura 3.2. Unidade experimental utilizada para a imobilização enzimática	62
Figura 4.1. Rendimento correspondente a cada uma das reações realizadas no primeiro bloco de experimentos	78
Figura 4.2. Grandes aglomerados gerados na reação em foi empregada uma vazão de 0,127 l/h	79
Figura 4.3. Análise cinética das conversões de monômero nas reações realizadas, avaliando o efeito da vazão	79
Figura 4.4. Influência de variáveis operacionais no teor de sólidos presentes no sobrenadante das diferentes reações: (A) vazão, (B) quantidade de emulsificante, (C) quantidade de iniciador	81
Figura 4.5. Distribuições de massas molares das partículas presentes no sobrenadante	82
Figura 4.6. Distribuições de massas molares das partículas casca-núcleo	84
Figura 4.7. Relação entre as massas molares ponderais médias (M_w) das partículas emulsificadas e das partículas casca-núcleo	86
Figura 4.8. Morfologia do núcleo polimérico produzido: (A) microscopia óptica, (B) microscopia eletrônica de varredura. A régua possui comprimento de 1000 μm	88
Figura 4.9. Morfologia das partículas poliméricas produzidas a partir da reação em que a vazão flutuou: (A) microscopia óptica, (B) microscopia eletrônica de varredura. A régua possui comprimento de 1000 μm	88
Figura 4.10. Partículas casca-núcleo produzidas: (A) uma casca vazia, produzida a partir da reação em $V=0,035$ l/h; (B) reentrâncias formadas na superfície das partículas na reação em que a vazão flutuou; (C) poros presentes nas partículas na reação em que $V=0,035$ l/h; (D) aglomerados formados na reação em que $V=0,039$ l/h; (E) aglomerados formados na reação em que $V=0,082$ l/h	89

Figura 4.11. Efeito da vazão de alimentação de monômero na distribuição de tamanho das partículas emulsificadas	91
Figura 4.12. Efeito da quantidade de emulsificante na distribuição de tamanho das partículas emulsificadas	91
Figura 4.13. Efeito da quantidade de iniciador na distribuição de tamanho das partículas emulsificadas	92
Figura 4.14. Efeito da vazão de alimentação na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo	94
Figura 4.15. Efeito da quantidade de emulsificante na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo	94
Figura 4.16. Efeito da quantidade de iniciador na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo	95
Figura 4.17. Efeito de cada uma das variáveis operacionais sobre a área específica dos suportes produzidos: (A) vazão de alimentação de monômero; (B) quantidade de emulsificante; (C) quantidade de iniciador	99
Figura 4.18. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e o volume específico de poros	100
Figura 4.19. Esquema da geração de partículas casca-núcleo	100
Figura 4.20. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e o volume específico de poros, avaliando apenas o efeito da morfologia das partículas emulsificadas	101
Figura 4.21. Relação existente entre área específica das partículas produzidas diâmetro médio de poro	102
Figura 4.22. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e o diâmetro médio de poro, avaliando apenas o efeito da morfologia das partículas emulsificadas	103
Figura 4.23. Efeito de cada uma das variáveis operacionais no volume específico de poros dos suportes produzidos: (A) vazão de alimentação de monômero; (B) quantidade de emulsificante; (C) quantidade de iniciador	104
Figura 4.24. Efeito de cada uma das variáveis operacionais no diâmetro médio de poro dos suportes produzidos: (A) vazão de alimentação de monômero; (B) quantidade de emulsificante; (C) quantidade de iniciador	105
Figura 4.25. Análise cinética das imobilizações realizadas, avaliando o efeito da vazão	106

Figura 4.26. Análise cinética das imobilizações realizadas, avaliando o efeito da quantidade de emulsificante e de iniciador	107
Figura 4.27. Análise cinética imobilizações realizadas baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante	107
Figura 4.28. Atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas considerando o primeiro bloco de reações	108
Figura 4.29. Atividade de esterificação das enzimas imobilizadas considerando apenas primeiro bloco de reações	110
Figura 4.30. Efeito da área específica dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: (A) rendimento de imobilização, (B) retenção de atividade	112
Figura 4.31. Efeito da área específica dos suportes na atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas	113
Figura 4.32. Efeito do volume específico de poros dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: (A) rendimento de imobilização, (B) retenção de atividade	113
Figura 4.33. Efeito do volume específico de poros dos suportes na atividade de hidrólise da enzima imobilizada	114
Figura 4.34. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: (A) rendimento de imobilização, (B) retenção de atividade	115
Figura 4.35. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes na atividade de hidrólise da enzima imobilizada	115
Figura 4.36. Efeito da área específica dos suportes na atividade de esterificação da enzima imobilizada	116
Figura 4.37. Efeito do volume específico de poros dos suportes na atividade de esterificação da enzima imobilizada	116
Figura 4.38. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes na atividade de esterificação da enzima imobilizada	117
Figura 4.39. Relação entre as variáveis observadas e as previstas pelo modelo de atividade de hidrólise.	121
Figura 4.40. Relação entre as variáveis observadas e as previstas pelo modelo de atividade de esterificação.....	122
Figura 4.41. Rendimento correspondente a cada uma das reações realizadas no segundo bloco de experimentos	125
Figura 4.42. Análise cinética das reações realizadas no segundo bloco experimental .	126

Figura 4.43. Distribuições de massas molares das partículas emulsificadas do segundo bloco de experimentos	127
Figura 4.44. Distribuições de massas molares das partículas casca-núcleo	128
Figura 4.45. Morfologia das partículas poliméricas produzidas: (A) (0 Iniciador; - Monômero); (B) (0 Iniciador; + Monômero). O tamanho da régua é igual a 100 μm .	130
Figura 4.46. Microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas: (A) (- Iniciador; - Monômero); (B) (- Iniciador; + Monômero)	131
Figura 4.47. Microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas: (A) (0 Iniciador; - Monômero); (B) (0 Iniciador; + Monômero)	131
Figura 4.48. Efeito da quantidade de monômero nas partículas emulsificadas produzidas com menor quantidade de iniciador	132
Figura 4.49. Efeito da quantidade de monômero nas partículas emulsificadas produzidas com mais iniciador, a quantidade de referência	133
Figura 4.50. Efeito da quantidade de monômero alimentado na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo, considerando as reações com menos iniciador	135
Figura 4.51. Efeito da quantidade de monômero alimentado na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo, considerando as reações com mais iniciador	135
Figura 4.52. Efeito da massa de monômero alimentada nas características morfológicas dos suportes produzidos: (A) área específica; (B) volume específico de poro; (C) diâmetro médio de poro	137
Figura 4.53. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e (A) volume específico de poros e (B) diâmetro médio de poros	138
Figura 4.54. Relação entre o diâmetro médio de poro e o diâmetro médio das partículas emulsificadas	139
Figura 4.55. Relação encontrada entre o diâmetro médio de poro e o diâmetro médio das partículas emulsificadas	139
Figura 4.56. Análise cinética das imobilizações realizadas no segundo bloco de reações, avaliando o efeito da quantidade de monômero alimentado	140
Figura 4.57. Análise cinética das imobilizações realizadas, no segundo bloco de reações, baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante.	141
Figura 4.58. Efeito da quantidade de monômero alimentada na atividade de hidrólise da enzima imobilizada	141
Figura 4.59. Efeito da quantidade de monômero alimentada na atividade de esterificação da enzima imobilizada	142

Figura 4.60. Efeito da área específica dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: (A) rendimento de imobilização, (B) retenção de atividade	144
Figura 4.61. Efeito da área específica dos suportes na atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas no segundo bloco de experimentos	145
Figura 4.62. Efeito do volume específico de poros dos suportes sobre os parâmetros de imobilização no segundo bloco de experimentos: (A) rendimento de imobilização, (B) retenção de atividade	145
Figura 4.63. Efeito do volume específico de poros dos suportes na atividade de hidrólise da enzima imobilizada	146
Figura 4.64. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: (A) rendimento de imobilização, (B) retenção de atividade	146
Figura 4.65. Influência do diâmetro médio de poro na atividade hidrolítica do biocatalisador	147
Figura 4.66. Efeito das propriedades morfológicas dos suportes sobre as atividades de esterificação das enzimas imobilizadas: (A) área específica, (B) volume específico de poros, (C) diâmetro médio de poro	148
Figura 4.67. Comparação entre as atividades hidrolíticas experimentais e as previstas pelo modelo considerando o segundo bloco de experimentos	149
Figura 4.68. Comparação entre as atividades de esterificação experimentais e as previstas pelo modelo considerando o segundo bloco de experimentos	149
Figura 4.69. Relação entre as variáveis observadas e as preditas pelo modelo, considerando a atividade hidrolítica	151
Figura 4.70. Relação entre as variáveis observadas e as preditas pelo modelo, considerando a atividade de esterificação	153
Figura A.1. Análise cinética das conversões de monômero nas reações realizadas, avaliando os efeitos da quantidade de iniciador e de emulsificante	163
Figura B.1. Curva de DSC da Reação 01	164
Figura B.2. Curva de DSC da Reação 02	164
Figura B.3. Curva de DSC da Reação 03	165
Figura B.4. Curva de DSC da Reação 04	165
Figura B.5. Curva de DSC da Reação 05	166
Figura B.6. Curva de DSC da Reação 07	166
Figura B.7. Curva de DSC da Reação 08	167
Figura B.8. Curva de DSC da Reação 09	167

Figura B.9. Curva de DSC da Reação 10	168
Figura B.10. Curva de DSC da Reação 11	168
Figura B.11. Curva de DSC da Reação 12	169
Figura B.12. Curva de DSC da Reação 13	169
Figura B.13. Curva de DSC da Reação 14	170
Figura B.14. Curva de DSC da Reação 15	170
Figura B.15. Curva de DSC da Reação 16	171
Figura B.16. Curva de DSC da Reação 17	171
Figura B.17. Curva de DSC da Reação 18	172

Lista de Tabelas

Tabela 3.1. Massa de cada um dos componentes envolvidos na etapa de polimerização em suspensão	53
Tabela 3.2. Massa de cada um dos componentes envolvidos na etapa de polimerização em emulsão	54
Tabela 4.1. Valor real das variáveis operacionais nas diferentes reações realizadas ...	77
Tabela 4.2. Valores das massas molares ponderais médias (M_n e M_w) e valores dos índices de polidispersão (IP) das partículas do sobrenadante relativos a cada uma das reações do primeiro bloco experimental	83
Tabela 4.3. Valores das massas molares ponderais médias (M_n e M_w) e valores dos índices de polidispersão (IP) relativos a cada uma das partículas casca-núcleo produzidas a partir das reações do primeiro bloco experimental	85
Tabela 4.4. Valores das temperaturas de transição vítrea das partículas produzidas ...	87
Tabela 4.5. Valores dos diâmetros médios das partículas emulsificadas	93
Tabela 4.6. Resultados de área específica, volume específico de poros e diâmetro médio de poro para cada um dos suportes produzidos	96
Tabela 4.7. Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações	111
Tabela 4.8. Matriz de correlação entre as diferentes variáveis envolvidas no sistema	119
Tabela 4.9. Modelo empírico que descreve a atividade hidrolítica da enzima imobilizada	120
Tabela 4.10. Modelo empírico que descreve a atividade de esterificação da enzima imobilizada	122
Tabela 4.11. Valor real das variáveis operacionais nas diferentes reações realizadas.	124
Tabela 4.12. Valores das massas molares ponderais médias (M_n e M_w) e valores dos índices de polidispersão (IP) relativos às partículas do sobrenadante nas reações do segundo bloco experimental	127
Tabela 4.13. Valores das massas molares ponderais médias (M_n e M_w) e valores dos índices de polidispersão (IP) relativos a cada uma das partículas casca-núcleo produzidas a partir das reações do segundo bloco	129
Tabela 4.14. Valores das temperaturas de transição vítrea das partículas produzidas	130
Tabela 4.15. Valores dos diâmetros médios das partículas emulsificadas	134

Tabela 4.16. Resultados de área específica, volume específico de poros e diâmetro médio de poro para os suportes produzidos	136
Tabela 4.17. Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações do segundo bloco.	143
Tabela 4.18. Modelo empírico que descreve a atividade hidrolítica dos biocatalisadores produzidos	151
Tabela 4.19. Modelo empírico que descreve a atividade de esterificação dos biocatalisadores produzidos	152
Tabela 4.20. Modelo empírico que descreve a atividade hidrolítica da enzima imobilizada a partir das variáveis operacionais	155
Tabela 4.21. Modelo empírico que descreve a atividade de esterificação da enzima imobilizada a partir das variáveis operacionais	156

Lista de Equações

Equação 3.1. Cálculo do rendimento	62
Equação 3.2. Cálculo do teor de sólidos	62
Equação 3.3. Cálculo da atividade hidrolítica da enzima solúvel	69
Equação 3.4. Cálculo do rendimento de imobilização	70
Equação 3.5. Cálculo da atividade hidrolítica do biocatalisador	70
Equação 3.6. Cálculo da retenção de atividade	71
Equação 3.7. Cálculo da atividade de esterificação da enzima imobilizada	72
Equação 3.8. Cálculo da concentração de proteína ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização	73
Equação 4.1. Cálculo da porosidade das partículas com morfologia casca-núcleo	101
Equação 4.2. Cálculo da área específica das partículas casca-núcleo, avaliando o efeito do raio médio de poro	102
Equação A.1. Cálculo da massa de monômero alimentada entre cada tempo de amostragem na etapa de emulsão alimentada	161
Equação A.2. Cálculo da massa total de monômero alimentado até o intervalo de tempo N+1	161
Equação A.3. Cálculo da massa total presente no reator até o intervalo de tempo N+1	162
Equação A.4. Cálculo de percentagem mássica de cada um dos componentes presentes no meio reacional no tempo N+1	162
Equação A.5. Cálculo da conversão no tempo N+1	162

Capítulo I

Introdução

1.1. Introdução

As enzimas vêm sendo amplamente empregadas em diferentes processos, na indústria alimentícia, têxtil, farmacêutica, na indústria de papel e no setor agrícola (BUCHERT *et al.*, 1994; SCHMID *et al.*, 2002; BEILEN e LI, 2002; VELLARD, 2003; CHEN *et al.*, 2007c; ACOSTA-MARTÍNEZ *et al.*, 2007; CHALAMAIAH *et al.*, 2012). Destaca-se também a atenção que os processos enzimáticos vêm recebendo por parte do setor de combustíveis, em função da busca por processos sustentáveis e por alternativas aos compostos de origem fóssil (BEILEN e LI, 2002; RIBEIRO *et al.*, 2011). Nas últimas décadas, houve um crescimento expressivo na comercialização global de enzimas, mercado este que deverá atingir \$7 bilhões em 2013 (HASHEMI *et al.*, 2012). Com relação especificamente ao mercado de enzimas no Brasil, observa-se uma grande defasagem em relação aos mercados mundiais. Em 2005, o mercado externo brasileiro foi avaliado em 147,2 milhões de dólares (3,7% do mercado internacional), sendo 126,6 milhões de dólares em importações e 20,6 milhões em exportações (BON *et al.*, 2008).

Os processos enzimáticos, em geral, apresentam baixo impacto ambiental e baixo custo energético, uma vez que normalmente empregam condições operacionais mais brandas e geram produtos mais puros, em função da elevada especificidade e seletividade das enzimas. No entanto, uma grande desvantagem desses processos reside no custo elevado dessas proteínas. Além disso, as enzimas, em geral, são utilizadas em processos conduzidos em fase homogênea. Dessa forma, a cada operação realizada há necessidade de repor o catalisador perdido ao final da reação. Uma alternativa para este problema consiste no emprego das enzimas na forma imobilizada (FREIRE, 1988; MATEO *et al.*, 2007).

A imobilização enzimática consiste no confinamento da enzima a suportes insolúveis em meio aquoso, por meio de mecanismos de adsorção física, ligação de

caráter covalente, encapsulamento ou reticulação (TAN *et al.*, 2010). O emprego de enzimas na forma imobilizada é muito vantajoso em relação aos processos enzimáticos usuais, pois permite a reutilização das enzimas, viabiliza a realização de operações contínuas e permite o uso de volumes reacionais reduzidos. Além disso, diversas propriedades enzimáticas podem ser potencializadas com a imobilização, como atividade, seletividade, especificidade, estabilidade e diminuição de inibições ocasionadas pelo próprio meio reacional (FREIRE, 1988; MATEO *et al.*, 2007).

No entanto, para empregar um material como suporte na imobilização enzimática, o mesmo deve apresentar algumas características específicas, como ser insolúvel em meio aquoso, apresentar elevada interação com a enzima (de forma a evitar a dessorção, mas sem provocar a desativação do sítio ativo) e ser estável mecanicamente. Assim, diversos materiais podem ser empregados como suporte, como compostos inorgânicos (sílica, alumina, apatita), polímeros naturais (dextrana e celulose) e polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliestireno). Porém, cada enzima interage de maneira particular com cada tipo de suporte, apresentando atividade característica após a imobilização, a depender do suporte utilizado. Nesse contexto, os polímeros sintéticos têm recebido especial destaque, uma vez que são de fácil produção e, em geral, apresentam baixo custo de síntese. Além disso, algumas das suas características podem ser manipuladas para viabilizar uma melhor interação entre a enzima e o suporte, como composição, porosidade, tamanho característico e a funcionalidade da superfície, com a introdução de grupamentos químicos específicos (KAHRAMAN *et al.*, 2007; BESTETI, 2009).

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou o desenvolvimento de novas partículas poliméricas, visando a empregá-las como suporte para a imobilização de enzimas. A etapa de produção das partículas foi baseada na técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, que possibilita a síntese de partículas porosas. O presente trabalho englobou não só a produção das partículas poliméricas, mas buscou também compreender como a morfologia das partículas é afetada pelas condições operacionais envolvidas durante a etapa de polimerização. Avaliou-se também como a morfologia das partículas poliméricas modifica os parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização e retenção de atividade. Os biocatalisadores sintetizados (no presente trabalho, o termo biocatalisador é associado ao suporte com a enzima adsorvida; ou seja, a enzima já imobilizada) também foram avaliados quanto ao

desempenho apresentado em reações de hidrólise do *p*-nitrofenil laurato e reações de esterificação do ácido oleico e etanol. A enzima utilizada ao longo de todo o trabalho foi a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B), enzima capaz de catalisar uma ampla série de reações, sendo empregada na síntese de biodiesel e na resolução de fármacos, por exemplo. O monômero empregado na etapa de polimerização foi o estireno, pois apresenta elevado grau de hidrofobicidade, de reatividade e gera polímeros com alta resistência mecânica.

A etapa correspondente à síntese das partículas poliméricas foi realizada no Laboratório de Engenharia de Polimerização do Programa de Engenharia Química da COPPE (EngePol/PEQ/COPPE). Já as etapas de imobilização enzimática, de determinação dos parâmetros de imobilização e de avaliação dos desempenhos dos biocatalisadores foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana do Instituto de Química (LaBiM/IQ).

1.2. Objetivo da Dissertação

1.2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho visa ao desenvolvimento de novas partículas poliméricas e à avaliação do seu uso como suporte para a síntese de biocatalisadores.

1.2.2. Objetivo Específico

O presente trabalho visa, mais especificamente, a aprofundar o estudo a respeito dos efeitos reacionais sobre a morfologia das partículas, procurando entender como a porosidade e a área específica das partículas dependem das concentrações de iniciador e de emulsificante, além da vazão de alimentação do monômero e da quantidade de monômero alimentada durante a etapa de polimerização. Além disso, busca-se mostrar como a porosidade e a área específica das partículas afetam os parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização e retenção de atividade. Buscou-se também construir modelos empíricos capazes de descrever as atividades dos biocatalisadores produzidos em função das propriedades morfológicas dos suportes utilizados e das variáveis operacionais envolvidas na etapa de polimerização. Vale

ressaltar que os biocatalisadores desenvolvidos podem ser aplicados em diferentes áreas, visando à síntese de biodiesel ou à produção de fármacos, por exemplo.

1.3. Estrutura da Dissertação

A dissertação está estruturada em cinco capítulos, incluindo esta introdução, dois apêndices e as referências bibliográficas. A seguir será realizada uma breve descrição de cada capítulo e dos apêndices que compõem o trabalho.

No Capítulo II é apresentada uma ampla revisão bibliográfica, sendo destacados os mecanismos envolvidos na polimerização em suspensão e na polimerização em emulsão. Em seguida, são apresentados os principais estudos disponíveis na literatura em relação à síntese de partículas com estrutura casca-núcleo e à técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. São descritas também as principais técnicas de imobilização enzimática. Os estudos já realizados que utilizaram partículas poliméricas porosas para a imobilização de lipases, especialmente da CAL-B, também são destacados. Por fim, são apresentados os trabalhos presentes na literatura técnica que empregaram as partículas poliméricas com estrutura casca-núcleo, sintetizadas a partir do processo de suspensão e emulsão simultâneas, para a imobilização enzimática.

No Capítulo III é mostrada a metodologia experimental adotada na etapa de síntese das partículas casca-núcleo por polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. São mostradas também as técnicas de caracterização das partículas poliméricas, como cromatografia de permeação em gel (GPC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica, calorimetria exploratória diferencial (DSC), de determinação da área específica das partículas, da distribuição de tamanhos das partículas do sobrenadante e da distribuição de tamanhos das partículas empregadas como suporte na imobilização. É mostrada também a metodologia experimental utilizada na etapa de imobilização enzimática e as técnicas usadas para determinação dos parâmetros de imobilização e para avaliação das atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores produzidos. As etapas envolvidas na análise estatística também são descritas neste capítulo.

No Capítulo IV são mostrados os resultados obtidos na etapa de polimerização, assim como todas as caracterizações de todas as partículas produzidas. São apresentados também os resultados encontrados na etapa de imobilização enzimática, englobando as

cinéticas de imobilização, os parâmetros de imobilização e os desempenhos dos biocatalisadores nas reações de hidrólise e de esterificação. O desenvolvimento dos modelos empíricos também é realizado neste capítulo.

No Capítulo V são apresentadas as principais conclusões encontradas a partir dos resultados obtidos no trabalho. São feitas também algumas sugestões para trabalhos futuros.

No Apêndice A são mostrados os cálculos envolvidos na análise cinética referente a cada reação de polimerização realizada. Assim, são apresentadas as equações necessárias para a determinação da conversão de monômero em cada ponto de amostragem. As evoluções das conversões dos blocos de reação em que ocorreu variação da quantidade de emulsificante e da quantidade de iniciador também são mostradas.

No Apêndice B são apresentadas as análises de calorimetria exploratória diferencial das partículas poliméricas sintetizadas que permitiram a determinação das temperaturas de transição vítrea da cada material produzido.

Capítulo II

Revisão Bibliográfica

O objetivo deste capítulo é descrever os principais mecanismos de polimerização, com ênfase nos processos em suspensão, emulsão e suspensão-emulsão simultâneas. Em seguida, são abordados os diferentes métodos de imobilização enzimática. Por fim, são apresentados os trabalhos em que as partículas poliméricas, principalmente as partículas casca-núcleo, são utilizadas como suporte para imobilização de enzimas, focando na imobilização da lipase CAL-B.

2.1. Mecanismos dos Processos de Polimerização

Os polímeros sintéticos podem ser obtidos a partir de uma série de mecanismos de polimerização. A depender do mecanismo envolvido na reação, é possível classificar as reações de polimerização em dois grandes grupos: polimerização em etapas, que envolve a reação entre os grupos funcionais presentes nos monômeros; e, polimerização em cadeia, que engloba as reações em que há adição sequencial de monômeros às cadeias poliméricas, sendo iniciadas pela presença de espécies reativas (iniciadores), como cátions, ânions, compostos de coordenação ou radicais livres (KIPARISSIDES, 1996; ODIAN, 2004).

Os processos de polimerização podem ser classificados, em geral, em dois grandes grupos: processos homogêneos e processos heterogêneos. O primeiro grupo engloba polimerizações conduzidas em uma única fase (polimerização em massa ou solução). Nos processos heterogêneos ou o polímero produzido é insolúvel no meio reacional (polimerização por precipitação) ou a polimerização ocorre com a presença de ao menos duas fases (polimerização em emulsão, por exemplo) (KIPARISSIDES, 1996; ODIAN, 2004).

Os processos heterogêneos, que englobam os processos em suspensão, emulsão, precipitação, dentre outros, são empregados para a síntese de partículas poliméricas.

Nesses sistemas, é normalmente mais fácil a manipulação do material polimérico final (suspenso numa fase contínua) e também a operação do processo de polimerização, reduzindo os problemas relacionados com viscosidades elevadas e com descontroles térmicos (DOWDING e VICENT, 2000; ODIAN, 2004).

Cada tipo de processo heterogêneo origina partículas com propriedades diferenciadas, que podem ser aplicadas para os mais diferentes fins. Além disso, é possível realizar a combinação dos processos apresentados, havendo a síntese de partículas com características ainda mais peculiares (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003). Dessa forma, partículas poliméricas esféricas ou irregulares são produzidas, apresentando diâmetro médio que pode variar de 10 nm a 1-2 mm (ARSHADY, 1992; QIU *et al.*, 2001). Os produtos resultantes desses processos apresentam enorme aplicabilidade na área médica, odontológica e de bioprocessos, como na síntese de cimentos ósseos, na produção de partículas para uso em embolização vascular ou como suporte para imobilização enzimática (PEIXOTO *et al.*, 2006; SANTOS, 2007; BESTETI, 2011). Segundo dados de 2003, mais de 10 milhões de toneladas de polímeros são produzidos anualmente em todo o mundo por processos de polimerização heterogêneos (ANTONIETTI e TAUER, 2003).

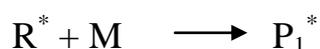
Os suportes sintetizados no presente trabalho são produzidos a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Dessa forma, esses dois processos são estudados com mais detalhe a partir da seção 2.1.2.

2.1.1. Polimerização em Cadeia via Radicais Livres

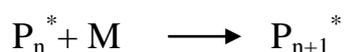
O mecanismo da polimerização em cadeia, como já mencionado, é iniciado a partir da presença de uma espécie reativa (o iniciador) no meio reacional. No presente trabalho, as espécies reativas são radicais livres gerados a partir da decomposição térmica dos iniciadores adicionados ao meio.

Esse tipo de polimerização envolve pelo menos três etapas básicas que ocorrem simultaneamente ao longo da reação. Outras etapas podem também ocorrer, a depender da reação particular estudada. Cada uma dessas etapas é apresentada de maneira simplificada a seguir.

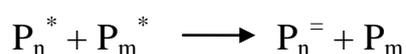
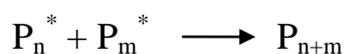
- I) Etapa de iniciação: nesta fase são gerados os radicais livres, responsáveis pelo início da reação de polimerização (KIPARISSIDES, 1996).



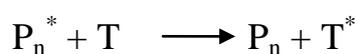
- II) Etapa de propagação: envolve as reações de crescimento da cadeia polimérica, nas quais ocorre a adição do monômero ao centro radicalar (KIPARISSIDES, 1996).



- III) Etapa de terminação: engloba as reações de término do crescimento da cadeia a partir da reação entre dois centros radicalares (KIPARISSIDES, 1996; BROOKS, 2010). A etapa de terminação pode ocorrer por combinação, em que duas espécies radicalares em crescimento se combinam gerando uma cadeia saturada, ou por desproporcionamento, em que um hidrogênio de uma espécie é transferido para a outra espécie, provocando o seu término, sendo geradas uma espécie insaturada e outra saturada (ODIAN, 2004).



- IV) Etapa de Transferência de Cadeia: esta etapa pode ocorrer ou não, a depender da polimerização estudada, e envolve a transferência de um átomo de hidrogênio do agente de transferência de cadeia para a cadeia em crescimento, ocorrendo o término de uma cadeia e a geração de outra espécie ativa. As espécies usualmente empregadas como agentes de transferência de cadeia são solventes, o próprio monômero ou outras espécies adicionadas ao meio, usualmente portadoras de átomos de hidrogênio ácidos, como alcoóis e mercaptanas (BROOKS, 2010).



As etapas descritas acima ocorrem em ambos os processos de polimerização estudados no presente trabalho, tanto na etapa em suspensão quanto na etapa em emulsão. Não há indícios de que a etapa de transferência de cadeia seja importante nas reações de estireno investigadas.

2.1.2. Processos de Polimerização em Suspensão

A polimerização em suspensão clássica apresenta um ou mais monômeros insolúveis em meio aquoso, contendo um iniciador solúvel na fase orgânica. A fase monomérica é dispersa em uma fase contínua, geralmente aquosa, sob forte agitação, havendo o uso de estabilizantes ou agentes de suspensão para manter a estabilidade do meio disperso. As gotículas de monômero são, então, convertidas paulatinamente a partículas poliméricas que, com o avançar da reação, tornam-se viscosas e pegajosas, adquirindo aspecto sólido ao final da reação. Assim, a polimerização em suspensão é semelhante a um conjunto de micro-reatores, em que cada gotícula atua como um reator operando uma polimerização em massa (ARSHADY, 1992; MACHADO *et al.*, 2007). A temperatura na qual essas reações são usualmente conduzidas encontra-se na faixa (50-100)°C (ARSHADY, 1992).

A técnica de polimerização em suspensão apresenta algumas desvantagens, quando comparada às demais técnicas de polimerização: menor produtividade em reator de mesma capacidade, quando comparada à polimerização em massa; maior consumo de água; possível incrustação de material polimérico nas paredes do reator e do impelidor, quando comparada à polimerização em solução; não há processo contínuo viável para ser empregado comercialmente até o momento, por conta dos problemas de incrustação (VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997).

No entanto, o processo de polimerização em suspensão reúne também diversas vantagens em comparação com os demais processos de polimerização (massa, solução e emulsão): as taxas de reação são maiores, quando comparadas às da polimerização em solução, pois cada gotícula funciona como um reator em massa, havendo um aumento da concentração de monômero no interior de cada uma; baixos níveis de impureza no produto final, quando comparada à emulsão, uma vez que as partículas são relativamente grandes, em geral (20-500) µm, e a separação do produto final ocorre facilmente por sedimentação, não havendo a necessidade de adição de coagulantes;

baixa viscosidade do meio reacional, mesmo a altas conversões; maior facilidade para remover o calor ao longo da reação, sendo mais eficaz o controle de temperatura; baixo custo para separação das partículas ao final do processo, quando comparada com as polymerizações em emulsão, em função novamente da faixa de tamanho das partículas; ao final da reação, são obtidas partículas esféricas com tamanho e forma relativamente homogêneos. Dessa maneira, esse processo é utilizado para a síntese de diversas resinas poliméricas comerciais importantes, como poliestireno e copolímeros, poli(metacrilato de metila) e copolímeros, poli(cloreto de vinila) e copolímeros, dentre outros (VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2007).

2.1.2.1. Tipos de Processo de Polimerização em Suspensão

A forma como o processo de polimerização é conduzido influi de forma significativa na cinética da reação, na morfologia e na homogeneidade das partículas produzidas. Dessa forma, é possível destacar seis tipos distintos de processos em suspensão:

I. Polimerização em suspensão tipo pérola

Neste sistema de polimerização, o polímero é solúvel no seu monômero. Inicialmente, o sistema comporta-se como uma suspensão de um líquido em outro líquido. Com o decorrer da reação, ocorre um aumento na viscosidade da fase dispersa. Neste momento, em função do caráter pegajoso das partículas, o controle para evitar a aglomeração das partículas torna-se crítico. Por fim, as partículas assumem uma forma rígida e o fenômeno de coalescência praticamente deixa de existir, caso a suspensão seja estável. Caso contrário, ocorre a coalescência generalizada das partículas, havendo a formação de uma massa polimérica sem forma. Assim, o limite que divide as duas últimas transições é conhecido por ponto de identificação da partícula, a partir do qual não é mais possível controlar a distribuição de tamanho das partículas (KIPARISSIDES, 1996; MACHADO *et al.*, 2007). A polimerização do tipo pérola ou

clássica é a empregada no presente trabalho na etapa da polimerização em suspensão, e será descrita na seção 2.1.5;

II. Polimerização em suspensão tipo granular

Este tipo de polimerização envolve processos nos quais o polímero não é solúvel no monômero. Desta forma, o polímero precipita com o decorrer da reação. Ao final do processo são obtidos grãos ou pós opacos e irregulares (MACHADO *et al.*, 2007);

III. Polimerização em massa-suspensão ou semi-suspensão

Este processo de polimerização engloba duas etapas. Inicialmente, é realizada uma polimerização em massa, até que uma determinada conversão seja atingida (25-30)%. Em seguida, o meio reacional viscoso é conduzido a outro reator, contendo água e estabilizante, onde é, então, realizada a polimerização em suspensão. A reação é conduzida até que se atinja a conversão desejada (MACHADO *et al.*, 2007);

IV. Polimerização inversa

Na polimerização inversa, há a dispersão de monômeros solúveis em água, como acrilamida e ácido acrílico, em um meio orgânico. A iniciação ocorre termicamente ou quimicamente, a partir de radicais livres oriundos de um azocomposto ou percomposto solúvel em água (ODIAN, 2004; MACHADO *et al.*, 2007);

V. Polimerização em microssuspensão

Neste processo, elevadas conversões são atingidas, como no processo em emulsão. A microssuspensão é semelhante à polimerização em suspensão tipo pérola, diferindo em relação ao tamanho das gotas monoméricas, em torno de 1 μm , em função da combinação de grandes quantidades de estabilizantes e altas taxas de cisalhamento (ODIAN, 2004; MACHADO *et al.*, 2007);

VI. Polimerização via radicais livres viva ou controlada em suspensão

Embora a polimerização em suspensão clássica apresente uma série de vantagens, uma limitação desta técnica são as elevadas massas molares e as largas distribuições de massas molares obtidas ao final do processo. Esses aspectos dificultam alguns tipos de processamento e usos. Assim, a polimerização radicalar viva ou controlada vem sendo aplicada em reações em suspensão, objetivando a redução das massas molares e o estreitamento das curvas de distribuição de massa molar. Neste tipo de polimerização, as reações de terminação e outras reações que provocam a “morte” das cadeias poliméricas em crescimento são inibidas ou completamente suprimidas com a adição de compostos reguladores (CUNNINGHAM, 2008; KIM *et al.*, 2012).

2.1.2.2. Iniciadores

Os iniciadores empregados na polimerização em suspensão clássica são solúveis na fase orgânica monomérica, onde ocorre a reação de polimerização (ODIAN, 2004). Os iniciadores geralmente empregados são iniciadores do tipo peróxidos orgânicos, como peróxido de benzoíla, e azocompostos, como azobis(isobutironitrila), pois são usualmente solúveis na fase orgânica. Em geral, o teor de iniciador encontra-se na faixa de (0,1 - 0,5) % em massa de monômero empregada na polimerização (VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997).

Ao longo da reação, os iniciadores são decompostos, termicamente, fotoquimicamente ou por reações de oxi-redução, gerando radicais livres (ODIAN, 2004). No entanto, nem toda espécie radicalar gerada no meio reacional participa de forma efetiva da reação, originando novas cadeias poliméricas. Isso ocorre porque as espécies presentes no meio, como monômeros e solventes, interagem com os radicais e formam uma espécie de capa ao redor dos mesmos. Dessa forma, a difusão dos radicais para fora desta espécie de “gaiola” é dificultada, inviabilizando, então, a formação de novas cadeias poliméricas. Esse efeito é conhecido por *Efeito Gaiola* e é um dos responsáveis pela presença de monômero residual nesses sistemas e pela queda da eficiência do sistema de iniciação (ARAÚJO *et al.*, 2002; ODIAN, 2004).

2.1.2.3. Efeitos Gel e Vítreo

Com o decorrer da reação de polimerização e o aumento da conversão, ocorre o aumento continuado da viscosidade do meio. Dessa forma, a mobilidade das cadeias em crescimento diminui, havendo uma queda significativa nas taxas de terminação. Conseqüentemente, ocorre um aumento líquido das taxas de polimerização, resultando em uma autoaceleração da reação. Esse efeito é chamado de efeito gel e pode provocar inclusive o descontrole térmico do sistema polimérico (KALFAS e RAY, 1993; KIPARISSIDES, 1996).

Em contrapartida, o aumento da viscosidade pode provocar um aumento expressivo nas resistências difusionais do meio, ocasionando a queda da mobilidade das cadeias poliméricas e das moléculas de monômero. Dessa maneira, ocorre uma queda também da constante cinética de propagação, reduzindo as taxas líquidas de reação. O efeito vítreo, como é conhecido este fenômeno, só se mostra evidente em polimerizações que são conduzidas abaixo da temperatura de transição vítrea do polímero, provocando a paralisação reacional em conversões abaixo de 100% (KIPARISSIDES, 1996).

2.1.2.4. Fatores Influentes na Distribuição de Tamanhos de Partícula

A distribuição de tamanhos de partícula afeta diretamente as propriedades finais dos materiais poliméricos produzidos (BROOKS, 2010). Sabe-se que a distribuição de tamanhos das gotas monoméricas e, conseqüentemente, a distribuição das partículas poliméricas formadas são resultado dos fenômenos de quebra e coalescência das gotas monoméricas ao longo da reação. Esse mecanismo pode ser alterado a partir de modificações da velocidade de agitação imposta ao sistema, da forma e do tamanho do reator, da forma do impelidor, da viscosidade de ambas as fases presentes no meio, da concentração e do tipo do estabilizante utilizado. O efeito de cada um dos fatores é apresentado a seguir.

- I. Estabilizante ou Agente de Suspensão – Nas polimerizações em suspensão geralmente são adicionadas pequenas quantidades de um agente de suspensão ou estabilizante. A função deste composto é

evitar a coalescência das gotas ao longo da polimerização, pois diminui a tensão interfacial, e também evita a aglomeração de partículas parcialmente polimerizadas durante a reação, a partir da formação de uma espécie de filme ao redor das partículas (ARSHADY, 1992; VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2007). A concentração e o tipo de estabilizante utilizado também são responsáveis pela distribuição de tamanhos das partículas. Os agentes de suspensão usualmente utilizados são polímeros solúveis em meio aquoso, como poli(álcool vinílico) e poli(vinilpirrolidona), ou partículas inorgânicas, como carbonato de cálcio ou sulfato de bário. Surfactantes também podem ser utilizados, em baixas concentrações, com função estabilizante (ARSHADY, 1992; DOWDING e VICENT, 2000).

- II. Velocidade de Agitação – É realizada uma vigorosa agitação do meio ao longo de toda a reação. Dessa forma, ocorre a “quebra” da fase monomérica em pequenas gotas com forma esférica (para minimizar a energia resultante da tensão interfacial). No entanto, apenas a agitação do meio não é suficiente para manter a dispersão estável, sendo também usados estabilizantes, como mencionado anteriormente. O aumento do grau de agitação, em geral, provoca uma diminuição das gotas monoméricas, em função das maiores tensões de cisalhamento. No entanto, estudos também mostram que uma maior agitação pode provocar um aumento das taxas de coalescência das gotas, havendo, então, um aumento no tamanho das partículas (VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; RAMIREZ e HERRERA-ORDONEZ, 2007).

- III. Tamanho e forma do reator e do impelidor – A depender da forma do reator e do tipo de impelidor, os fenômenos de quebra e coalescência são concentrados em determinadas regiões do reator, pois perfis espaciais diferentes de cisalhamento são formados no interior do vaso de reação. Dessa forma, reatores e impelidores diferentes dão origem a distribuições de tamanhos de partícula distintas (ARSHADY, 1992;

DOWDING e VICENT, 2000). Vale destacar que a presença ou ausência de chicanas também pode provocar alterações nas distribuições de tamanhos de partícula (LENZI, 2002).

- IV. Viscosidade – O aumento da viscosidade da fase contínua, por intermédio da adição de gomas xantana ou gelatina, por exemplo, provocam uma diminuição na frequência de colisão das gotas monoméricas, aumentando a estabilidade das gotículas. Efeito semelhante é observado com o aumento da viscosidade da fase dispersa, que pode ser alcançado a partir de solubilização do próprio polímero no monômero em questão. Logo, ao aumentar a estabilidade das gotículas, novos perfis de distribuição de tamanhos de partícula são gerados (DOWDING e VICENT, 2000).

2.1.3. Processos de Polimerização em Emulsão

A polimerização em emulsão, apesar de apresentar algumas similaridades com a polimerização em suspensão, possui também diferenças mecanísticas e reacionais. Esses processos de polimerização diferem em relação ao tipo de iniciador utilizado nas reações, ao tamanho das partículas produzidas, à massa molar das cadeias poliméricas geradas e aos mecanismos de transferência de massa que envolvem as diferentes espécies do meio reacional (ODIAN, 2004). Os principais componentes da polimerização em emulsão são a fase monomérica, geralmente constituída por um ou mais monômeros insolúveis em meio aquoso, um meio dispersante, em geral água, um iniciador solúvel na fase aquosa e emulsificantes (WANG *et al.*, 1994; ODIAN, 2004). Outros componentes podem ser adicionados ao meio, como bicarbonato de sódio, com o objetivo de conferir maior estabilidade ao látex, caso ocorram variações no pH ao longo da reação (LENZI, 2002). As partículas geradas por esse processo apresentam diâmetros médios entre (50-300) nm (QIU *et al.*, 2001).

Diversos materiais podem ser sintetizados a partir do processo de polimerização em emulsão, como poli(acetato de vinila); copolímeros resultantes da reação de butadieno, estireno e acrilonitrila; polimetacrilatos; poli(cloreto de vinila); e poli(acrilamidas) (ODIAN, 2004). Assim, os polímeros resultantes podem ser

empregados para os mais diferentes fins, como em revestimentos, tinturas, adesivos, borrachas, recheios de colunas cromatográficas, liberação controlada de fármacos, dentre outros (WANG *et al.*, 1994).

A polimerização em emulsão apresenta uma série de vantagens em relação aos demais processos de polimerização. Como o sistema permanece fluido ao longo de toda a polimerização, o controle térmico e a agitação do sistema são facilitados. Muitas vezes o látex produzido, como é chamado o material sintetizado ao final da emulsão, pode ser utilizado diretamente, sem haver a necessidade de etapas de separação. O processo em emulsão é o único no qual é possível aumentar a massa molar das cadeias poliméricas sem reduzir a taxa de polimerização, enquanto nos outros processos há quase sempre uma relação inversa entre taxa de polimerização e a massa molar. Além disso, a massa molar pode ser facilmente controlada a partir da introdução de agentes de transferência de cadeia ao meio reacional (WANG *et al.*, 1994; ODIAN, 2004). No entanto, este sistema também apresenta desvantagens, como dificuldade de remoção de emulsificantes e coagulantes do polímero final, o que pode demandar uma série de etapas de purificação; e maiores custos de produção, quando comparado com o sistema em suspensão (KIPARISSIDES, 1996).

Na metade da década de 40, Harkins (1945a, 1945b, 1947) elaborou uma série de hipóteses para explicar os fenômenos envolvidos no processo de polimerização em emulsão. As principais hipóteses desenvolvidas foram: o iniciador é decomposto na fase aquosa, gerando radicais livres que se encaminham até as micelas formadas pelo emulsificante e inchadas com monômero, onde ocorre a formação das partículas poliméricas; a presença de excesso de emulsificantes no meio promove a formação de micelas, mas também promove a estabilização das gotas de monômero e das partículas poliméricas formadas; o aumento na quantidade de emulsificante resulta na formação de um maior número de partículas, que apresentam conseqüentemente tamanhos menores; as partículas poliméricas são formadas majoritariamente no interior das micelas; a gota de monômero funciona principalmente como um reservatório de monômero que alimenta as micelas e partículas poliméricas formadas; as partículas poliméricas crescem até a entrada de um segundo radical, ocorrendo, então, a terminação da cadeia, embora a entrada de outro radical possa promover novamente o crescimento da cadeia (LENZI, 2002).

A partir das hipóteses desenvolvidas por Harkins (1945a, 1945b, 1947) e de estudos posteriores, pôde-se dividir de forma didática o processo da polimerização em emulsão clássica em três etapas principais. Cada uma das etapas é descrita a seguir (WANG *et al.*, 1994; LENZI, 2002; ODIAN, 2004; CHERN, 2006).

- I. Na etapa inicial, os iniciadores são decompostos, gerando radicais livres. Em seguida, estes radicais são capturados pelas micelas, ocorrendo a nucleação (nucleação micelar ou heterogênea) e a formação inicial das partículas poliméricas. O sistema é caracterizado pela presença de micelas e gotas monoméricas, havendo o aumento do número e do tamanho das partículas poliméricas. As gotas de monômero servem como fonte de alimentação de monômero para as micelas e as partículas poliméricas formadas, uma vez que as moléculas monoméricas difundem através do meio aquoso, sendo adsorvidas pelas micelas e partículas, permitindo, então, seu crescimento. Nessa fase, a conversão varia na faixa de (0 - 10)%;
- II. A etapa intermediária se inicia quando a nucleação das micelas se encerra. É caracterizada pela ausência de micelas, por um número constante de partículas poliméricas inchadas com monômeros e pelo crescimento de tais partículas. A conversão, nesta etapa, varia na faixa entre (10 - 40)%. As gotas de monômero funcionam como reservatório de monômero e surfactante para as partículas em crescimento;
- III. A etapa final começa com o desaparecimento das gotas de monômero. Essa etapa é caracterizada pelo número constante de partículas, pela queda na concentração de monômero ainda presente nas partículas e também pela redução de monômero residual presente na fase aquosa. Esta fase corresponde a conversões entre (40 - 100)%. Vale salientar que os efeitos gel e vítreo mencionados na polimerização em suspensão também estão presentes nesta etapa da polimerização em emulsão, havendo a necessidade de um melhor controle de temperatura do meio reacional, para evitar o descontrole térmico.

Destacam-se três mecanismos principais envolvidos na formação de partículas poliméricas na polimerização em emulsão, considerando o iniciador solúvel em meio aquoso: (1) os radicais livres, presentes na fase aquosa, entram nas micelas inchadas com monômero, iniciando a polimerização (nucleação micelar); (2) os radicais livres gerados no meio aquoso reagem com as moléculas de monômero dissolvidas no meio aquoso, havendo o crescimento da cadeia polimérica, até que o limite de solubilidade é excedido e ocorre a precipitação do polímero, formando-se novas partículas (nucleação homogênea); (3) os radicais presentes no meio aquoso entram na gota de monômero, iniciando a polimerização nas gotas (nucleação na gota) (NOMURA *et al.*, 2005). Vale ressaltar, contudo, que a área específica das micelas é muito superior à área das gotas monoméricas, de maneira que a probabilidade de um radical ser capturado por uma gota de monômero é muito baixa. Dessa forma, as partículas são formadas, principalmente por nucleações homogêneas e heterogêneas, a não ser que as gotas sejam muito pequenas e não haja excesso de emulsificante (processos em miniemulsão) (ASUA, 2002).

Caso as partículas não estejam estabilizadas, pode ocorrer a coagulação das mesmas, fenômeno conhecido por nucleação coagulativa. No entanto, esse fenômeno é reduzido quando a concentração de surfactante está acima da CMC (concentração micelar crítica) (NOMURA *et al.*, 2005).

Para o estireno, monômero utilizado no presente trabalho, mais de 99% das nucleações que ocorrem quando a concentração de emulsificante está acima da CMC são nucleações micelares (ODIAN, 2004). Dessa forma, as demais rotas de nucleação podem ser desprezadas.

2.1.3.1. Tipos de Processo de Polimerização em Emulsão

A polimerização em emulsão engloba alguns sistemas que apresentam características distintas do processo em emulsão clássico. Dessa forma, é possível destacar seis tipos diferentes de processos em emulsão:

I. Polimerização em emulsão clássica

Neste sistema de polimerização, os componentes principais são o monômero, insolúvel em água, um meio dispersante, geralmente água,

emulsificante e iniciador, solúvel na fase aquosa (ODIAN, 2004). O diâmetro médio as partículas encontra-se na faixa (50-300) nm (QIU *et al.*, 2001). A polimerização em emulsão clássica é a técnica mais utilizada de polimerização em emulsão (RAO e GECKELER, 2011);

II. Polimerização em microemulsão

Neste sistema de polimerização, a quantidade de surfactante adicionada ao meio é bastante elevada, para gerar partículas muito pequenas. O tamanho das partículas encontra-se usualmente na faixa (10-30) nm (QIU *et al.*, 2001; RAO e GECKELER, 2011);

III. Polimerização em miniemulsão

Os processos em miniemulsão envolvem a presença de água, monômero(s), iniciador, surfactante e um co-estabilizante, utilizado para estabilizar as gotas de monômero, evitando, assim, sua coalescência. Nesse sistema, as partículas poliméricas são formadas a partir da nucleação das pequenas gotas de monômero, sendo evitada a formação de micelas. São utilizados nessas reações dispersores, como sonicadores ou homogeneizadores de alta pressão, capazes de produzir altas taxas de cisalhamento no meio e gotas de monômero muito pequenas (LANDFESTER *et al.*, 2000; ASUA, 2002). O tamanho das partículas geralmente encontra-se na faixa (30-100) nm (QIU *et al.*, 2001);

IV. Polimerização em emulsão livre de emulsificante

Em algumas aplicações da emulsão polimérica, como as que envolvem a calibração de instrumentos, a presença de agentes emulsificantes é maléfica. A posterior remoção do surfactante da superfície das partículas também pode provocar a desestabilização do látex. Assim, é utilizada a emulsão livre de emulsificante. Geralmente esta técnica gera um número menor de partículas, se comparada com as emulsões clássicas (ODIAN, 2004). Nesse caso, a estabilização é

normalmente em função da produção de surfactantes *in situ*, com o uso de iniciadores que geram fragmentos polares;

V. Polimerização via radicais livres viva ou controlada em emulsão

Neste tipo de polimerização, similarmente ao que ocorre em suspensão, as reações de terminação e outras que provocam a “morte” das cadeias poliméricas em crescimento são inibidas. Essa inibição é provocada por diferentes agentes de regulação que são adicionados ao sistema e que provocam a dormência dessas espécies ativas (QIU *et al.*, 2001; CUNNINGHAM, 2008);

VI. Polimerização em emulsão inversa

Nesse sistema, ocorre a dispersão de um monômero hidrofílico em uma fase contínua orgânica. Também são utilizados emulsificantes, para possibilitar a formação de micelas (LIM *et al.*, 2002; ODIAN, 2004). O tamanho das partículas encontra-se na faixa (100 - 1000) nm (QIU *et al.*, 2001).

As três técnicas de polimerização mais empregadas atualmente para a síntese de nanopartículas são as técnicas em emulsão, miniemulsão e microemulsão (RAO e GECKELER, 2011).

2.1.3.2. Iniciadores

O processo de polimerização em emulsão, ao contrário do processo em suspensão, envolve iniciadores solúveis em fase aquosa. Os iniciadores mais comumente empregados são persulfato de amônio, persulfato de potássio e peróxido de hidrogênio (ARSHADY, 1992; ODIAN, 2004).

Os radicais gerados em meio aquoso geralmente são tão hidrofílicos que não conseguem entrar nas micelas e nas partículas poliméricas. Assim, esses radicais se propagam no meio aquoso, até que se tornam suficientemente hidrofóbicos para entrar por difusão nas micelas e nas partículas poliméricas (CASEY *et al.*, 1993; ASUA, 2004).

2.1.3.3. Surfactantes

Surfactantes são moléculas anfifílicas que apresentam uma parte apolar e uma parte polar. Nos processos em emulsão, os surfactantes aniônicos (como dodecilbenzeno sulfonato de sódio e dodecil sulfato de sódio (SDS)) são mais largamente empregados, em função do baixo custo e do desempenho satisfatório que apresentam (SHAW, 1992; ODIAN, 2004).

A adição desses componentes ao meio provoca a redução da tensão interfacial entre as fases orgânica e aquosa, havendo, então, uma maior estabilidade das gotas de monômero e promove também a estabilidade das partículas poliméricas formadas, já que evita a aglomeração das partículas. Além disso, caso o surfactante presente no meio reacional esteja acima da sua concentração micelar crítica (CMC), ocorre a formação de micelas, que são agregados organizados de moléculas de surfactante. A CMC é a concentração acima da qual ocorre a formação expressiva de micelas sem haver uma redução significativa na tensão superficial ou interfacial.

A concentração micelar crítica do dodecil sulfato de sódio, surfactante empregado no presente estudo, em água a 40 °C é 0,0086 mol.dm⁻³ (SHAW, 1992). Assim, será possível perceber adiante que as concentrações de emulsificante empregadas em todas as reações encontram-se acima da CMC.

2.1.3.4. Fatores Influentes na Distribuição de Tamanhos de Partícula

O tamanho final das partículas do látex não apresenta uma relação direta com o tamanho das gotas monoméricas e das micelas formadas inicialmente. No entanto, a fração de monômero dissolvido no meio aquoso apresenta grande importância na determinação do tamanho final das partículas poliméricas. O tamanho das partículas também é influenciado pelas concentrações de emulsificante e de iniciador empregadas na polimerização e também pela temperatura da reação. A concentração de sais, que controla a viscosidade e a força iônica do meio, também afeta diretamente o tamanho das partículas poliméricas, uma vez que afetam o processo de nucleação. Sabe-se que há uma relação entre a taxa de nucleação e o tamanho final das partículas poliméricas. Apesar do período de nucleação das partículas ser relativamente curto, conversões

menores que 10%, é ele que controla o tamanho médio das partículas da emulsão e também a distribuição de tamanhos, sendo o principal parâmetro que controla o processo de nucleação a concentração de emulsificante. Quanto mais emulsificante, menor o tamanho das partículas. Em contrapartida, quanto mais curto o período de nucleação das partículas, associado à menor concentração de emulsificante no meio, maior o diâmetro médio das partículas produzidas e mais estreitas são as curvas de distribuição (ARSHADY, 1992; CHERN, 2006). Percebeu-se para látices de poliestireno que o aumento na concentração de iniciador é acompanhado pela diminuição do tamanho de partícula, pois o processo de nucleação das micelas é facilitado (GOODWIN *et al.*, 1974).

É importante salientar que o tamanho das partículas também pode depender do grau de agitação do reator, além de ser função das características do reator e do impelidor utilizados (RAMIREZ *et al.*, 2005).

Algumas propriedades das emulsões poliméricas, como reologia e potencial para formação de filme, diretamente atrelados à aplicabilidade das emulsões, são fortemente dependentes do tamanho médio e da distribuição de tamanhos das partículas do látex (CHERN, 2006). Por isso, é necessário controlar as distribuições de tamanho nos sistemas industriais reais.

2.1.4. Processos de Síntese de Partículas Poliméricas com Estrutura Casca-Núcleo

Os processos que envolvem a síntese de partículas com estrutura casca-núcleo constituem um grupo, dentre as diferentes técnicas de polimerização, que tem recebido especial destaque nos últimos anos. As partículas com morfologia casca-núcleo são formadas por estruturas poliméricas distintas, apresentando um núcleo e uma casca, que o recobre, cujas propriedades físico-químicas e morfológicas diferem (FERGUSON *et al.*, 2002; LENZI, 2002; CUI *et al.*, 2007). Dessa forma, são produzidos materiais com propriedades peculiares, incluindo a síntese de partículas porosas e com áreas específicas expressivas (LENZI, 2002; BESTETI 2009; BESTETI, 2011). É possível ainda empregar materiais cujo núcleo seja formado por componentes menos nobres, diminuindo então o custo do produto final, e também funcionalizar a casca de tais partículas, ampliando ainda mais o campo de aplicações (CUI, *et al.*, 2007; BESTETI,

2009). Vale ressaltar que outros processos podem ser empregados para a síntese de partículas porosas, por exemplo, o que envolve inicialmente a síntese de partículas contendo solventes em seu interior e uma etapa posterior em que há a expansão desses compostos, ocorrendo, então, a geração de poros (GOKMEN e DU PREZ, 2012).

Diferentes processos poliméricos podem ser empregados para a síntese de partículas com estrutura casca-núcleo que encontram aplicações em diferentes áreas. Na área biomédica, por exemplo, partículas casca-núcleo podem ser utilizadas em embolizações vasculares; na área de bioprocessos, para produção de suportes empregados na imobilização de enzimas; na área de espumas, para fabricação de materiais para isolamento térmico; na área de embalagens (OKUBO *et al.*, 1999; PEIXOTO *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2009; BESTETI, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2011). Essas partículas podem ser empregadas também para a produção de tintas e síntese de pigmentos para recobrimento de papéis (VELEV *et al.*, 1996; KOSKINEN e WILÉN, 2009; REDDY *et al.*, 2011).

As partículas com morfologia casca-núcleo podem ser sintetizadas a partir de diferentes técnicas de polimerização, como suspensão, emulsão, miniemulsão, dispersão, podendo ocorrer também a combinação dessas técnicas. Vale ressaltar que os processos podem ser conduzidos em batelada ou batelada alimentada (OKUBO e LU, 1996; OKUBO *et al.*, 1999; FERGUSON *et al.*, 2002; LANDFESTER *et al.*, 2002; LENZI, 2002; GU *et al.*, 2005; CUI, 2007; BORTHAKUR *et al.*, 2010; DEBNATH e KHATUA, 2011).

Um dos processos mais empregados para a síntese de partículas casca-núcleo é a polimerização em dois estágios com o emprego de sementes, oriundas de uma emulsão. Nesse tipo de processo inicialmente ocorre a polimerização em emulsão convencional, havendo a formação das sementes. Em seguida, outra reação de polimerização é conduzida, havendo o recobrimento destas sementes por uma nova casca polimérica. Para empregar esta técnica, há a necessidade de controlar as nucleações secundárias do monômero do segundo estágio da polimerização. Dessa forma, assegura-se a formação de uma casca polimérica ao redor do núcleo e não a formação de uma mistura de partículas isoladas, formadas a partir da primeira e segunda reações. FERGUSON *et al.* (2002) sintetizaram partículas casca-núcleo de poli(acetato de vinila) e poliestireno, avaliando estratégias para evitar a formação de partículas secundárias. Além disso, procuraram compreender de que forma o tamanho das sementes afetava o recobrimento.

Primeiramente, foi feita a síntese das partículas de poliestireno que, em seguida, foram utilizadas como semente em uma polimerização em emulsão, havendo, então, a formação de uma casca de poli(acetato de vinila). DZIOMKINA *et al.* (2006) produziram partículas com estrutura casca-núcleo a partir da síntese de sementes poliméricas de poliestireno, seguida da copolimerização de estireno e monômeros catiônicos. KARLSSON *et al.* (2000) também utilizaram esta técnica para a síntese de partículas com núcleo de poliestireno e casca e poli(estireno-co-butadieno-co-ácido metacrílico), avaliando o efeito das sementes na morfologia das partículas geradas.

Em muitos estudos são realizadas funcionalizações da casca ou da casca e do núcleo, alterando ainda mais as propriedades dos materiais produzidos. VELEV *et al.* (1996) estudaram a síntese de partículas casca-núcleo formadas por um núcleo, constituído por agregados de látex de amidina, rodeado por uma casca de látex contendo sulfato. CUI *et al.* (2007) sintetizaram nanopartículas de poliacrilatos recobertas por uma casca polimérica contendo silício e flúor. Primeiramente foi realizada a síntese das nanopartículas, sementes, a partir de uma reação de polimerização em emulsão livre de surfactante. Em seguida, iniciou-se o processo de recobrimento, a partir da polimerização de monômeros contendo flúor e silício. BORTHAKUR *et al.* (2010) estudaram a síntese de partículas com estrutura casca-núcleo a partir de reações em miniemulsão. Foi feito o recobrimento de partículas inorgânicas modificadas (bentonite modificada com amina) por um copolímero de poli(estireno-co-acrilato de metila). MADANI *et al.* (2011) sintetizaram nanopartículas magnéticas, apresentando um núcleo magnético contendo Fe_3O_4 recoberto por poliestireno. Vale ressaltar que não houve formação de estruturas porosas nos estudos descritos.

Outra técnica muito utilizada para a obtenção de partículas do tipo casca-núcleo é a polimerização por dispersão empregando sementes. Nesses processos, em geral, a viscosidade das sementes é tão elevada que as cadeias poliméricas presentes no meio, formadas a partir da polimerização por dispersão, não conseguem difundir para o interior da partícula. Dessa forma, os polímeros formados passam a se acumular sobre a superfície das sementes. OKUBO *et al.* (1997, 1999) sintetizaram partículas casca-núcleo a partir de reações de polimerização por dispersão do estireno, utilizando sementes de poli(metacrilato de metila). Novamente, não houve formação de partículas porosas a partir desses estudos realizados.

Um processo também utilizado para a produção de partículas com morfologia casca- núcleo envolve a etapa de heterocoagulação. São sintetizadas partículas com tamanhos distintos que apresentam cargas contrárias, partículas poliméricas catiônicas e aniônicas. Essas partículas são colocadas em contato, havendo o recobrimento das partículas maiores pelas menores em função da diferença de cargas (OKUBO e LU, 1996; OTTEWILL *et al.*, 1997).

Estudos também foram realizados com o objetivo de produzir partículas casca-núcleo a partir da reação de saponificação total ou parcial da superfície do núcleo, gerando, assim, a casca. Vale destacar que este é um tipo de funcionalização que envolve uma reação química de componentes do núcleo e não o depósito de outro tipo de partícula na superfície (o que ocorre no presente trabalho), evidenciando outras formas de funcionalização de partículas poliméricas. PINTO *et al.* (2004b, 2006) depositaram patentes que reivindicam o processo de síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, formadas por núcleo de poli(acetato de vinila) e casca de poli(álcool vinílico), assim como a aplicação de tais partículas em embolizações vasculares. Outros estudos realizados baseados na técnica descrita foram desenvolvidos por PEIXOTO *et al.* (2006, 2009, 2011).

GU *et al.* (2005) estudaram um processo de síntese de partículas com morfologia casca-núcleo a partir da combinação dos processos de polimerização em emulsão e em suspensão. Inicialmente, foi realizada uma polimerização em emulsão, havendo a síntese do látex. Em seguida, a este látex foram adicionados mais monômero e iniciador. O processo em emulsão foi, então, transformado em suspensão, promovendo-se a quebra do látex com a adição de eletrólitos. Assim, houve a produção de partículas poliméricas casca-núcleo contendo em seu interior vários núcleos, formados na etapa inicial do processo, na etapa da emulsão.

Uma técnica que também pode ser empregada é a polimerização em suspensão com o emprego de sementes. Em uma primeira etapa, as sementes são geradas a partir da polimerização em suspensão convencional. As partículas obtidas ao final da reação são lavadas e secas. Em seguida, são adicionados às sementes monômero e solução de iniciador. As sementes tornam-se inchadas pelo monômero adicionado e, em função da presença do iniciador, a polimerização em suspensão é conduzida. Ocorre, assim, a formação de partículas com morfologia casca-núcleo. A morfologia das partículas é controlada pela difusão do monômero adicionado na segunda etapa da reação para o

interior das sementes. Assim, quanto maior o tempo de inchamento das partículas, mais monômero difunde para o interior das sementes e maior é a espessura que a casca apresenta (GONÇALVES *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009). No primeiro estudo mencionado, foram sintetizadas partículas com núcleo de poliestireno e casca de poli(metacrilato de metila); no segundo, foram formadas partículas com casca de poliestireno, poli(metacrilato de metila) e poli(acrilato de metila). DEBNATH e KHATUA (2011) empregaram técnica similar para a síntese de partículas casca-núcleo. Contudo, estudaram a incorporação de argila tanto na casca quanto no núcleo. Observaram, então, um aumento na estabilidade térmica desses materiais poliméricos na presença de tal composto inorgânico.

2.1.5. Partículas Casca-Núcleo Sintetizadas a partir da Polimerização em Suspensão e Emulsão Simultâneas

LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) estudaram a síntese de partículas porosas por meio da polimerização simultânea em suspensão e emulsão. O processo desenvolvido engloba uma etapa inicial, a polimerização em suspensão, na qual ocorre a formação do núcleo. Quando a polimerização em suspensão atinge uma determinada conversão, novos constituintes são alimentados ao sistema, sendo iniciada a etapa de polimerização em emulsão. Os processos em emulsão e suspensão são conduzidos simultaneamente. As partículas geradas pela polimerização em emulsão são capturadas pelo núcleo, aglomerando-se ao seu redor, em função do caráter pegajoso do mesmo. Ocorre, assim, a formação de uma casca porosa ao redor do núcleo, gerando partículas com morfologia casca-núcleo. A característica porosa dessas espécies difere das apresentadas pelos materiais obtidos quando os processos são conduzidos separadamente, por meio dos quais partículas sem poros são geradas (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003). Na Figura 2.1 é possível observar a estrutura da partícula polimérica produzida a partir do processo descrito. Esta nova técnica desenvolvida resultou em uma patente, na qual PINTO *et al.* (2004a) reivindicam o processo desenvolvido e a aplicação de tais partículas com morfologia casca-núcleo na imobilização de células e enzimas.



Figura 2.1. Polímero com estrutura casca-núcleo.

Adaptado de (LENZI et al., 2003).

A partir do estudo desenvolvido por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003), observou-se também que a formação da casca dependia da conversão apresentada pelo núcleo. A conversão atingida deveria estar abaixo de um valor limite, possibilitando a captura das partículas emulsificadas. Além disso, percebeu-se, que quanto maior o tamanho das partículas do núcleo, menor era a área de contato com as partículas emulsificadas e menor era a eficiência do recobrimento do núcleo. Uma grande vantagem deste processo em relação aos demais, apresentados anteriormente, é a condução simultânea dos dois processos no mesmo reator, sem existir qualquer separação dos componentes e sem haver qualquer etapa intermediária de purificação.

ZHENQIAN *et al.* (2009) estudaram a síntese de partículas com estrutura casca-núcleo, com núcleo de poliestireno e casca de poli(metacrilato de metila), utilizando uma técnica semelhante à desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003). Inicialmente foi realizada a polimerização em suspensão do estireno, gerando partículas de poliestireno. Em seguida, no mesmo meio reacional, iniciou-se a polimerização em emulsão do metacrilato de metila. Foi mostrado, então, que a composição da emulsão afetava diretamente a distribuição de tamanhos das partículas formadas, assim como a formação da casca. Percebeu-se também, assim como LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003), que o instante a partir do qual se iniciava a emulsão afetava de maneira significativa a forma das partículas produzidas. Contudo, há uma diferença operacional sutil em relação ao processo desenvolvido por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003): uma emulsão foi alimentada ao sistema. LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) adicionaram apenas o monômero, sendo os demais constituintes da emulsão adicionados no início da alimentação, o que reduz riscos de incrustações no interior das bombas de

alimentação. Não foram analisadas, no estudo em questão, a área específica das partículas e a porosidade das mesmas.

BESTETI (2009) e BESTETI *et al.* (2011) empregaram a técnica desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) para a sintetizar diferentes suportes, estudando diferentes composições da casca e do núcleo. Estudou-se a influência das composições da casca e do núcleo sobre a porosidade e a área específica dos polímeros produzidos. A partir do trabalho realizado, percebeu-se que, quando a casca foi formada por polímeros cuja temperatura de transição vítrea era inferior à temperatura do meio reacional, havia a formação de um filme ao redor do núcleo, sem haver a formação de poros. No entanto, quando a temperatura de transição vítrea do polímero da casca foi maior que a temperatura do meio reacional, ocorria a formação de uma casca porosa. Além disso, observou-se que as composições da casca e do núcleo provocam modificações na estrutura da casca. Notou-se também uma possível relação existente entre o diâmetro médio de poro das partículas sintetizadas e o diâmetro médio das partículas emulsificadas. Foi possível perceber ainda que a compatibilidade química entre os monômeros da casca e do núcleo era fundamental para haver a formação eficaz da casca, ocorrendo reações de copolimerização quando monômeros distintos eram empregados para a síntese do núcleo e da casca. A Figura 2.2 ilustra o mecanismo envolvido na síntese das partículas com estrutura casca-núcleo, considerando a maneira como a temperatura de transição vítrea dos polímeros da casca afeta a morfologia final das partículas.

PENG *et al.* (2011) estudaram a síntese de partículas casca-núcleo a partir da polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, utilizando técnica similar à desenvolvida por ZHENQIAN *et al.* (2009). Primeiramente foi preparada uma emulsão com os monômeros de interesse. Separadamente foi realizado um processo de copolimerização em suspensão, para formação de núcleos poliméricos contendo flúor em sua estrutura. Ao atingir uma determinada conversão, a emulsão preparada foi adicionada à suspensão parcialmente realizada. Assim, as reações foram conduzidas conjuntamente, sendo obtidas partículas casca-núcleo quando a etapa de polimerização em emulsão era iniciada durante o estágio intermediário da etapa de suspensão. Novamente, não foi feito qualquer estudo sobre a porosidade e a área específica das partículas produzidas.

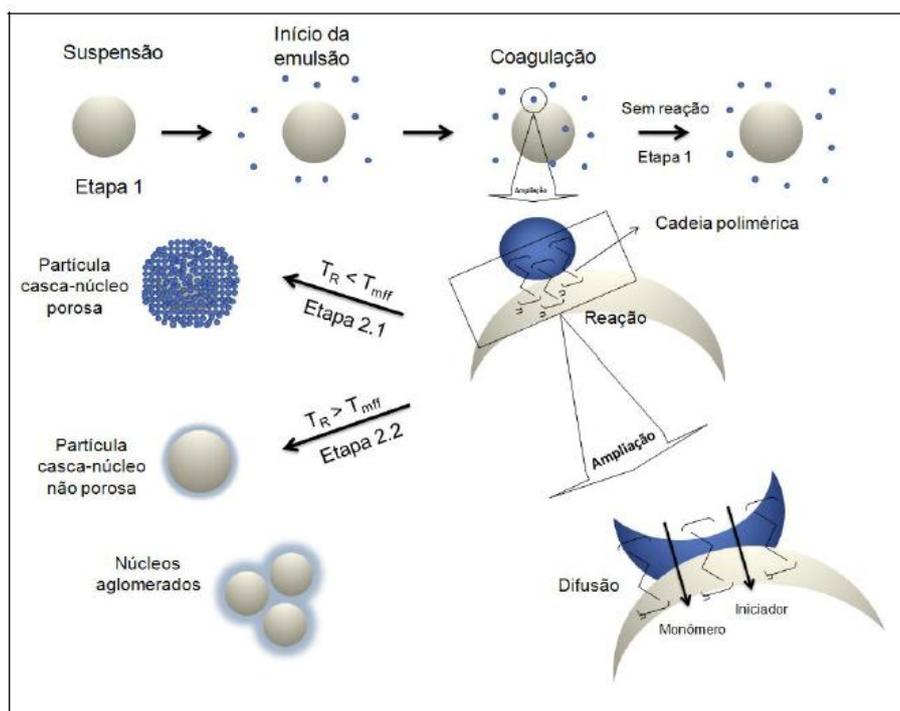


Figura 2.2. Mecanismo de formação das partículas com morfologia casca-núcleo.

Adaptado de (BESTETI, 2009).

BESTETI (2011) também estudou a síntese de partículas com estrutura casca-núcleo por intermédio do processo apresentado por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003). Foi constatado que a presença de divinilbenzeno nas partículas casca-núcleo provocava um aumento na porosidade e na área específica dos suportes produzidos, sendo obtidas partículas com área específica de até 28,9 m²/g (partículas com casca e núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno)). Observou-se também que vazões de alimentação de monômero acima de 0,2 l/h, para reações envolvendo poliestireno, provocavam uma instabilidade na reação, levando a seu descontrole. Os materiais produzidos apresentaram resultados satisfatórios quando aplicadas como suportes para imobilização da lipase B de *Candida antarctica*, apresentando resultados próximos aos observados para o biocatalisador comercial Novozyme® 435.

Diferentes trabalhos propõem a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, no entanto as etapas de formação do núcleo e da casca ocorrem em momentos diferenciados. Apenas seis trabalhos foram encontrados envolvendo a síntese de partículas casca-núcleo a partir do processo simultâneo em suspensão e emulsão

(LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2004a; BESTETI, 2009; ZHENQIAN *et al.*, 2009; BESTETI, 2011; BESTETI *et al.*, 2011; PENG *et al.*, 2011), sendo um artigo (LENZI *et al.*, 2003) e uma patente (PINTO *et al.*, 2004a) derivados de uma tese (LENZI, 2002) e um artigo (BESTETI *et al.*, 2011) derivado de uma tese (BESTETI, 2009).

Alguns estudos também foram desenvolvidos com o objetivo de controlar e monitorar as reações de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Uma técnica utilizada para este fim é espectroscopia do infravermelho próximo, que possibilitou o acompanhamento de formação da casca ao longo da polimerização (LENZI *et al.*, 2006).

2.2. Imobilização Enzimática

As propriedades particulares das enzimas têm estimulado o seu emprego nos mais diferentes processos. A elevada seletividade que apresentam, englobando estereosseletividade, regioseletividade e quimioseletividade, alta especificidade e capacidade de catalisar reações sob condições suaves de temperatura, pressão, pH e com minimização de reações paralelas indesejáveis constituem algumas das vantagens dos processos enzimáticos (FREIRE, 1988). No cenário da biocatálise, um grupo de enzimas que tem recebido especial destaque são as lipases (FREIRE e CASTILHO, 2008).

Lipases são biocatalisadores capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, apresentando elevada seletividade, estabilidade e eficiência. Tais propriedades estimulam a aplicação dessas enzimas em diferentes áreas, como na indústria alimentícia, farmacêutica, de química fina, de cosméticos, de biossensores, no tratamento de efluentes, dentre outras (VILLENEUVE *et al.*, 2000; FREIRE e CASTILHO, 2008). Destaca-se também a aplicação de tais enzimas na síntese de biodiesel, sendo empregadas em reações de esterificação e transesterificação. Nos processos enzimáticos visando à síntese de biocombustíveis, as condições operacionais são mais brandas, se comparadas com os processos convencionais, e os produtos gerados são mais puros, mas o elevado custo dessas proteínas e a presença de efeitos inibitórios e de desnaturação enzimática dificultam a implantação desses processos (RANGANATHAN *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Os processos nos quais as enzimas são utilizadas na forma solúvel apresentam algumas desvantagens, como dificuldade de reutilizá-las e dificuldade de realização de operações contínuas. Além disso, há a necessidade de isolar o produto final do meio reacional, de maneira a interromper a atividade catalítica da enzima e garantir a qualidade do produto. Os tratamentos térmicos ou de pH realizados para cessar a atividade enzimática podem provocar alterações significativas no produto final. Assim, uma possível solução para os problemas apresentados ou uma forma de minimizá-los é a imobilização enzimática (FREIRE, 1988).

No início do século XX, a imobilização de enzimas começou a ser estudada a partir de estudos de adsorção da enzima invertase em carvão ativo (NELSON e GRIFFIN, 1916). Inúmeras pesquisas começaram, então, a ser realizadas nessa área, para desenvolvimento de alternativas ao uso de enzimas na forma solúvel.

A imobilização enzimática consiste no confinamento da enzima em suportes insolúveis no meio aquoso, por intermédio de interações físicas ou ligações químicas entre as enzimas e os suportes. Há uma série de vantagens associadas à utilização das enzimas na forma imobilizada, como a possibilidade de reutilização das mesmas; possibilidade de realização de operações contínuas; obtenção de produtos mais puros e mais facilmente separáveis; possibilidade de aumento da estabilidade enzimática; emprego de volumes reacionais reduzidos, dentre outras. No entanto, a imobilização enzimática também apresenta algumas desvantagens, como o custo adicional com o suporte e os reagentes necessários para a realização da imobilização; o custo adicional da operação de imobilização; a possibilidade de perda de atividade da enzima; os possíveis impedimentos estéricos e difusionais de produtos e substratos induzidos pela estrutura morfológica do suporte; e o maior risco de contaminação (FREIRE, 1988; CASTRO *et al.*, 2008). É importante enfatizar que, caso o procedimento de imobilização não seja muito custoso, caso seja possível recuperar de forma eficaz a atividade enzimática ao final da operação e caso a meia-vida operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa, o custo global do processo cai, tornando extremamente atrativo o processo de imobilização enzimática (CASTRO *et al.*, 2008).

2.2.1. Métodos de Imobilização Enzimática

Diferentes métodos podem ser usados para imobilizar enzimas e torná-las insolúveis no meio aquoso. Vale ressaltar, que alguns métodos podem ser combinados, de forma a aumentar a eficiência do processo de imobilização. Além disso, é importante salientar que, a depender do método empregado, o biocatalisador produzido apresentará propriedades particulares. Algumas dessas técnicas são brevemente descritas a seguir.

I. Oclusão

Este método envolve a imobilização de enzimas a matrizes semipermeáveis que possibilitam a difusão de substratos e produtos, mas impedem a liberação da enzima para a solução. A oclusão pode ser realizada em géis poliméricos (as enzimas ficam aprisionadas nos interstícios da rede polimérica); em fibras (as proteínas ficam presas nas microcavidades das fibras); ou por microencapsulação (engloba o encapsulamento das enzimas por membranas poliméricas semi-permeáveis) (KENNEDY e WHITE, 1985; FREIRE, 1988; SHELDON, 2007; CASTRO, 2008);

II. Ligação Cruzada Intermolecular

Este método compreende a formação de ligações covalentes entre as moléculas de enzima por meio da utilização de reagentes reticulantes bi- ou multi- funcionais, havendo a formação de agregados enzimáticos insolúveis em meio aquoso, não sendo necessária a utilização de suportes. Este método, contudo, apresenta algumas desvantagens, como a necessidade de empregar elevadas quantidades de enzima. Além disso, muitas vezes, o sítio ativo da enzima é recoberto, em função das ligações cruzadas formadas, ocorrendo a desativação da enzima (KENNEDY e WHITE, 1985; FREIRE, 1988; SHELDON, 2007; CASTRO *et al.*, 2008);

III. Ligação a Suportes

Este é o método mais antigo e o mais simples para realizar a imobilização enzimática (NELSON e GRIFFIN, 1916; KENNEDY e WHITE, 1985; CASTRO *et al.*, 2008). O método envolve a ligação de enzimas a suportes sólidos, orgânicos ou inorgânicos, insolúveis em meio aquoso. A interação entre a enzima e o suporte pode ocorrer por adsorção física, envolvendo forças de atração relativamente fracas, como interações hidrofóbicas e força de Van der Waals. Dessa forma, praticamente não ocorre mudança conformacional significativa da enzima ao longo do processo de imobilização. A adsorção física da enzima ao suporte depende de inúmeras variáveis, como pH, natureza do solvente, força iônica do meio, concentração de enzima e relação proteína-suporte empregados na imobilização, tempo de imobilização e temperatura do meio. As propriedades morfológicas do suporte, incluindo tamanho de partícula, área específica e diâmetro médio de poros, também devem ser consideradas. No entanto, em função da fraca interação entre a enzima e o suporte, frequentemente ocorre a dessorção da proteína, podendo haver a perda de atividade do biocatalisador com o aumento do número de reutilizações e também a contaminação do produto pela enzima utilizada (KENNEDY e WHITE, 1985; FREIRE, 1988; SHELDON, 2007; CASTRO *et al.*, 2008).

A ligação da enzima ao suporte pode ocorrer também por intermédio de ligação iônica, estabelecendo-se uma ligação iônica entre as moléculas das enzimas e dos suportes sólidos. Essas interações são muito mais fortes que as envolvidas no mecanismo de adsorção física. Dessa forma, podem ocorrer mudanças na conformação das enzimas. Os suportes empregados são matrizes de troca iônica e são preparados a partir de suportes orgânicos ou inorgânicos (KENNEDY e WHITE, 1985; FREIRE, 1988; SHELDON, 2007; CASTRO *et al.*, 2008).

A presença de metais de transição na superfície dos suportes também pode provocar a ligação a enzimas, havendo a formação de quelatos

(KENNEDY e WHITE, 1985; FREIRE, 1988; CASTRO *et al.*, 2008).

Finalmente, a ligação de enzimas a suportes pode também envolver a formação de ligações covalentes entre a enzima e o suporte, conduzindo à formação de enzimas imobilizadas bastante estáveis (KENNEDY e WHITE, 1985; FREIRE, 1988; SHELDON, 2007; CASTRO *et al.*, 2008).

É importante ressaltar que a cada ano novos métodos de encapsulamento, de oclusão, novos suportes e novas maneiras de tornar os agregados enzimáticos insolúveis são desenvolvidos, de forma a tornar a enzima imobilizada mais ativa e estável, apresentando maior aplicabilidade no meio industrial (BRADY e JORDAAN, 2009).

O presente estudo envolveu a síntese de suportes poliméricos para posterior uso em imobilizações enzimáticas. Dessa forma, os tópicos e questões abordados a seguir estão relacionados ao último método apresentado de imobilização, Ligação a Suportes, e na interação existente entre enzimas e suportes.

2.2.2. Efeitos da Imobilização na Cinética e Estabilidade das Enzimas Imobilizadas

É fundamental a compreensão das mudanças nas propriedades físicas e químicas que ocorrem com as enzimas durante a imobilização. Em função do novo ambiente que é criado com a imobilização enzimática a suportes, são observadas alterações na estabilidade, na atividade e nas propriedades cinéticas das enzimas (KENNEDY e WHITE, 1985; FREIRE, 1988). A seguir são apresentados alguns efeitos que provocam alterações no desempenho da enzima após a imobilização.

I. Efeitos conformacionais

Esses efeitos estão relacionados à interação entre a molécula de enzima e o suporte, o que pode provocar mudanças na estrutura tridimensional da enzima e no seu sítio ativo (FREIRE, 1988).

II. Efeitos estereoquímicos

Esses efeitos estão associados à falta de acessibilidade que algumas regiões da enzima passam a apresentar após a imobilização. Pode haver, então, uma perda de atividade enzimática em função de um possível efeito de exclusão do sítio ativo, ficando menos acessível ao substrato (FREIRE, 1988).

III. Efeito de partição

Esses efeitos estão relacionados a interações hidrofóbicas, hidrofílicas ou eletrostáticas entre o suporte e o substrato e entre o suporte e o produto, provocando um gradiente de concentração de substrato e de produto entre o seio do fluido e a superfície das partículas de catalisador (FREIRE, 1988; TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO *et al.*, 2008);

IV. Efeitos difusionais

Após a imobilização, efeitos difusionais podem ser pronunciados, efeitos estes praticamente desprezíveis quando a enzima se encontra na sua forma solúvel. Com a imobilização, o substrato precisa migrar do seio do fluido até a superfície do catalisador (difusão externa), e da superfície do suporte até o sítio ativo da enzima (difusão interna). Depois do substrato ser convertido a produto pela ação enzimática, o produto deve difundir do centro ativo da enzima até a superfície do suporte (difusão interna) e, em seguida, difundir da superfície do suporte até o seio do fluido (difusão externa). Assim, podem ocorrer limitações de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima e também é possível haver acúmulo de produto nas proximidades do sítio ativo, ambos responsáveis por uma queda de atividade enzimática (FREIRE, 1988; CASTRO *et al.*, 2008).

Com relação especificamente às lipases, observa-se um aumento da atividade enzimática em meios aquo-restritos, com substratos insolúveis em meio aquoso (RIBEIRO *et al.*, 2011). Especialmente na presença de interfaces do tipo óleo-água ou interfaces (suporte hidrofóbico)-(meio aquoso), ocorre uma mudança conformacional na enzima, de forma que o sítio ativo pode ficar ainda mais exposto ao substrato, havendo,

então, um aumento da atividade (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998). A Figura 2.3 ilustra o mecanismo de adsorção da lipase a suportes hidrofóbicos. É possível observar a exposição do sítio ativo da lipase quando a enzima é colocada em contato com suportes hidrofóbicos. Isso ocorre, pois alguns elementos da estrutura secundária dessas enzimas cobrem o sítio ativo das mesmas, como uma espécie de tampa. Contudo, ao entrar em contato com superfícies hidrofóbicas, há uma mudança conformacional desses elementos, havendo a exposição do sítio ativo das lipases. Essa mudança conformacional não é observada quando outras proteínas são empregadas. Vale ressaltar que sob condições de baixa força iônica a adsorção de lipases é favorecida em relação às demais proteínas presentes no extrato proteico, condições de imobilização empregadas no presente trabalho (BASTIDA *et al.*, 1998). É importante destacar também que, especificamente para a CAL-B, a existência da tampa ainda não está bem definida (UPPENBERG *et al.*, 1995; LUTZ, 2004).

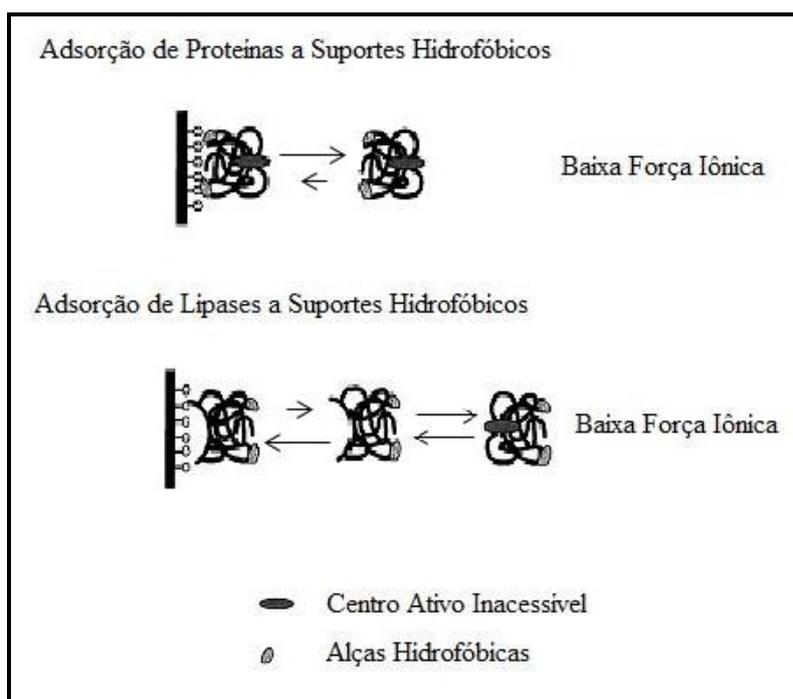


Figura 2.3. Mecanismo de adsorção da lipase a suportes hidrofóbicos.

Adaptado de (FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998).

Os processos de imobilização também podem provocar alterações significativas na estabilidade enzimática, podendo levar ao aumento ou à diminuição da estabilidade (KENNEDY e WHITE, 1985). Assim, o conhecimento sobre a estabilidade da enzima

na forma imobilizada é de suma importância para que se possa avaliar a viabilidade da implantação do processo estudado. Há alguns fatores que afetam a estabilidade das enzimas imobilizadas: natureza intrínseca da enzima; tipo de reator utilizado no processo; tipo de suporte utilizado na imobilização, pois, a depender do suporte empregado, é possível ocorrer até mesmo a desnaturação da enzima; método empregado para a imobilização (FREIRE, 1988).

É importante salientar que, ao mencionar estabilidade da enzima imobilizada, dois ramos precisam ser considerados: a estabilidade operacional e a estabilidade ao armazenamento. A estabilidade ao armazenamento está associada à capacidade da enzima em manter sua atividade no período entre a síntese e a utilização. Já a estabilidade operacional está relacionada à capacidade que a enzima possui em manter sua atividade durante o uso; ou seja, está associada ao tempo de meia-vida da enzima imobilizada nas condições de operação (LEMOS *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2008). A imobilização em suportes sólidos é uma das estratégias utilizadas para aumentar a estabilidade operacional e de armazenamento de enzimas; contudo, não é uma técnica universal, apresentando comportamentos diferenciados, a depender da enzima, do suporte e do processo de imobilização (MATEO *et al.*, 2007; IYER e ANANTHANARAYAN, 2008). A partir de estudos realizados por CUNHA (2011), percebeu-se que a lipase CAL-B imobilizada em suportes poliméricos de poliestireno apresentava-se estável durante o período avaliado de armazenamento de dois meses.

2.2.3. Suportes Empregados na Imobilização Enzimática

A seleção do suporte a ser empregado e do tipo de interação existente entre a enzima e o suporte são de extrema relevância no processo de imobilização. A interação entre a enzima e o suporte gera um biocatalisador com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas particulares (KENNEDY e WHITE, 1985; TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO *et al.*, 2008). Para avaliar de forma eficiente o desempenho do biocatalisador produzido, inúmeros fatores devem ser considerados, como pH, temperatura, força iônica do meio, agitação do meio, presença de solventes, composição química e morfologia do suporte, dentre muito outros. Esses parâmetros afetam a conformação da enzima e a velocidade de transferência de massa de substratos e produtos; logo, apresentam um papel importantíssimo na avaliação do comportamento

da enzima imobilizada (TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO *et al.*, 2008). A Figura 2.4 ilustra o desempenho do biocatalisador como resultado da interação entre diferentes fatores envolvidos diretamente no processo de imobilização, como as propriedades intrínsecas da enzima e do suporte, a interação existente entre a enzima e o suporte, o método de imobilização e a forma de operação do sistema no qual o biocatalisador deve ser empregado (CASTRO *et al.*, 2008).

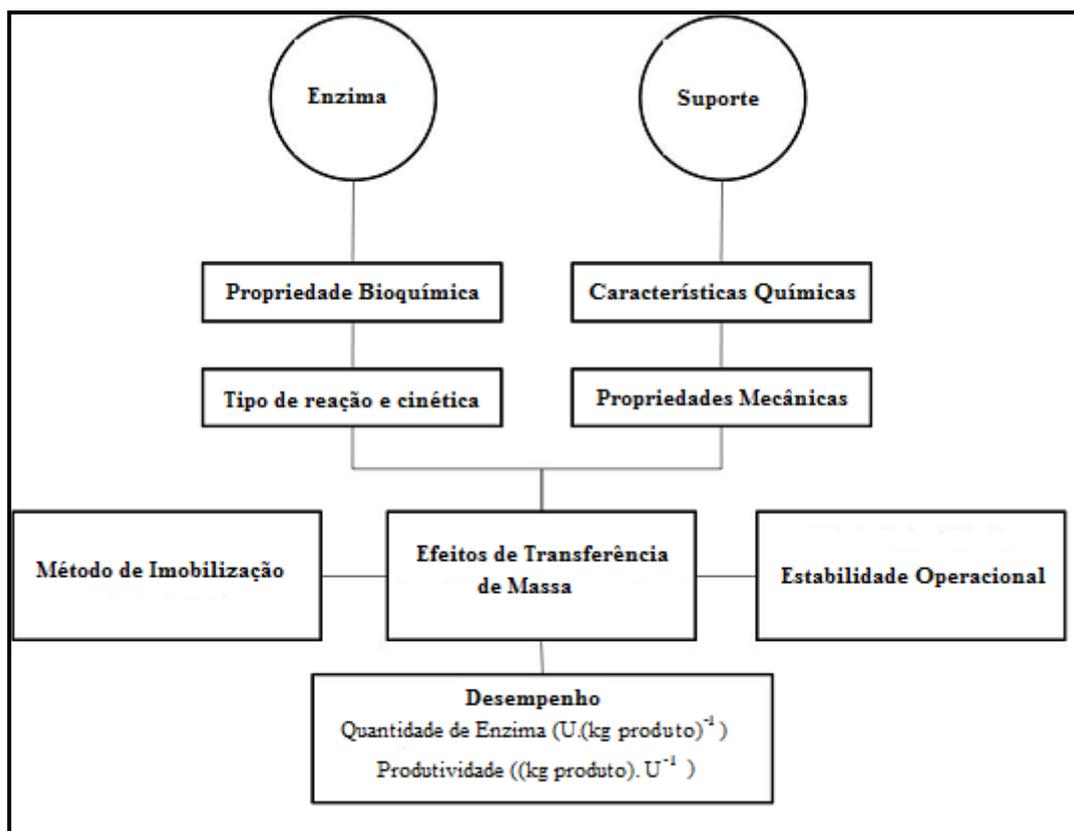


Figura 2.4. Fatores responsáveis pelo desempenho do biocatalisador.

Adaptado de (TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO et al., 2008).

Diversos suportes podem ser empregados no processo de imobilização de enzimas. Contudo, para um suporte ser empregado de forma satisfatória, alguns fatores devem ser considerados: apresentar custo de produção relativamente baixo; ser insolúvel em meio aquoso; apresentar área específica elevada para interagir com a enzima; ser resistente quimicamente em relação aos demais componentes do meio reacional; apresentar resistência mecânica; ser resistente a contaminações microbianas; apresentar estabilidade térmica; haver a possibilidade de ser regenerado após a utilização; possuir diâmetro médio de poros adequado, de forma a permitir o acesso

enzimático e de substrato à área interna do suporte, no caso do emprego de suportes porosos; a depender da enzima, apresentar natureza hidrofílica, pois alguns suportes hidrofóbicos provocam a diminuição da estabilidade e da atividade de algumas enzimas imobilizadas (KENNEDY e WHITE, 1985; CASTRO *et al.*, 2008). Ao considerar especificamente as lipases, alguns estudos mostraram aumento na atividade enzimática após a imobilização, principalmente quando foram utilizados suportes hidrofóbicos, muito provavelmente em função das interações entre esses suportes e as lipases, havendo maior exposição do sítio ativo (BALCÃO *et al.*, 1996).

Suportes com diferentes composições podem ser empregados para imobilização enzimática, incluindo polímeros naturais, como quitina, quitosana, gelatina, dextrana e celulose, e polímeros sintéticos, como poliacrilamida, poli(álcool vinílico), poliestireno, dentre outros. Materiais inorgânicos também podem ser utilizados para imobilizar enzimas, destacando-se a sílica, a alumina e a hidroxiapatita, pois são, geralmente, estáveis termicamente e mecanicamente, não são tóxicas e são resistentes à presença de solventes orgânicos e a ataques microbianos (KENNEDY e WHITE, 1985; KAHRAMAN *et al.*, 2007; RESHMI *et al.*, 2007).

No entanto, a depender do suporte utilizado no processo de imobilização, o biocatalisador pode apresentar uma atividade distinta. Assim, numerosos estudos estão sendo realizados para o desenvolvimento de novos polímeros sintéticos, uma vez que são sintetizados com facilidade e apresentam usualmente baixo custo. Além disso, algumas de suas características podem ser modificadas com certa simplicidade, como composição, porosidade, tamanho de partícula e também presença de grupamentos químicos específicos na superfície. Dessa forma, é possível produzir para cada tipo de enzima estudada o suporte mais apropriado para a sua imobilização. No entanto, os suportes sintéticos apresentam comumente algumas desvantagens, como baixa estabilidade à presença de solventes e baixa resistência a contaminações microbianas (KAHRAMAN *et al.*, 2007; BESTETI, 2009).

Pode-se perceber que não há um procedimento universal de imobilização válido para todas as enzimas. Também é utópica a ideia de que haverá um suporte que origine sempre o melhor biocatalisador. Em função das diferentes características químicas das inúmeras enzimas, das distintas propriedades dos vários substratos e produtos e das condições operacionais nas quais a enzima imobilizada será empregada, haverá um determinado suporte mais apropriado que resultará em um biocatalisador com o melhor

desempenho. Esta área do conhecimento, pouco desenvolvida no Brasil, é denominada de Engenharia de Suportes.

Muitos trabalhos estão sendo desenvolvidos a respeito do processo de imobilização de enzimas, utilizando suportes inorgânicos ou suportes inorgânicos funcionalizados com grupamentos orgânicos. KAHRAMAN *et al.* (2007) estudaram a imobilização por ligação covalente da α -amilase em suportes de sílica que continham grupamentos amida e cloreto na superfície. LEI *et al.* (2004) estudaram a imobilização da lisozima em partículas de sílica mesoporosas. RESHMI *et al.* (2007) estudaram a imobilização via adsorção da α -amilase em suportes de zircônia. Todos reportaram boas atividades das enzimas imobilizadas.

2.2.3.1. Suportes Poliméricos Empregados na Imobilização Enzimática

Diferentes suportes poliméricos vêm sendo empregados no processo de imobilização enzimática. A seguir serão apresentados alguns dos estudos encontrados na literatura técnica sobre o assunto em questão, mantendo como foco os processos que envolvem a presença da lipase B de *Candida antarctica*.

PALOMO *et al.* (2002) estudaram a adsorção de lipases sintetizadas por diferentes micro-organismos, incluindo a CAL-B, em suporte polimérico hidrofóbico comercial, octadecil-Sepabeads (suporte à base de polimetacrilato, funcionalizado com grupamentos octadecila). Esse suporte, além de ser hidrofóbico, apresenta estrutura porosa e rígida. Observou-se, assim, uma hiperativação das enzimas imobilizadas, quando comparadas ao seu estado solúvel. As lipases imobilizadas se apresentaram também mais estáveis a efeitos térmicos e à presença de solventes.

Foi analisado o efeito do tamanho de partículas de poli(metacrilato de metila) na imobilização da CAL-B, avaliando-se o rendimento de imobilização, a fração de sítios ativos e o desempenho da enzima imobilizada na síntese de poliésteres. Observou-se que, quanto menor era o tamanho das partículas, maior era a quantidade de proteína adsorvida e maior era a conversão obtida na geração do poliéster. Contudo, foi observada queda na fração de enzima na forma ativa (CHEN *et al.*, 2007a).

CHEN *et al.* (2007b) estudaram, a partir de partículas poliméricas porosas de poliestireno, os efeitos do diâmetro médio de partículas e diâmetro médio de poro no processo de imobilização da enzima CAL-B. Observaram que a enzima apresentava

enorme afinidade pelo suporte polimérico, sendo adsorvida com expressiva rapidez. Percebeu-se também que a fração de enzima que permaneceu ativa na forma imobilizada não dependia do tamanho das partículas poliméricas nem do diâmetro de poro, ao menos para a faixa estudada. Observou-se também que, para uma determinada quantidade de enzima adsorvida, ocorria o aumento da velocidade de síntese de poliéster (reação catalisada pela CAL-B imobilizada, neste caso) com o aumento do diâmetro de poro do suporte.

CHEN *et al.* (2008) imobilizaram a enzima CAL-B em micropartículas poliméricas de um polimetacrilato por ligação covalente. Foram utilizadas também, para efeito comparativo, nanopartículas com núcleo de poliestireno e casca de poli(metacrilato de glicidila) não porosas. O biocatalisador produzido a partir das nanopartículas foi o que apresentou maior atividade. Além disso, a reutilização das enzimas imobilizadas por ligação covalente mostrou-se mais eficaz que o reuso das enzimas imobilizadas por adsorção física.

A imobilização de diferentes enzimas em diversos suportes, incluindo a imobilização por adsorção física da CAL-B em octil-agarose (suporte formado por polissacarídeos funcionalizado com grupamentos octila), octadecil-Sepabeads (suporte à base de polimetacrilato, funcionalizado com grupamentos octadecila) e poli(hidroxibutirato) foi estudada por MENDES (2009). Em uma etapa seguinte, diferentes enzimas imobilizadas foram selecionadas e utilizadas para a síntese de biodiesel. A CAL-B imobilizada apresentou máxima conversão após 72 h de reação. No entanto, a lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em poli(hidroxibutirato) foi a que apresentou a maior produtividade em 24h.

CABRERA *et al.* (2009) estudaram a imobilização da enzima CAL-B em diferentes suportes hidrofóbicos, incluindo octil-agarose (suporte formado por polissacarídeos funcionalizado com grupamentos octila), butil-agarose (suporte formado por polissacarídeos funcionalizado com grupamentos butila), octadecil-Sepabeads (suporte à base de polimetacrilato, funcionalizado com grupamentos octadecila) e Lewatit (poli(metil-metacrilato-co-divinilbenzeno)). Os desempenhos de tais enzimas imobilizadas foram comparados ao do biocatalisador comercial, Novozyme® 435, que é resultado da imobilização da CAL-B no suporte polimérico Lewatit (CHEN *et al.*, 2008). Percebeu-se, então, que as maiores atividades enzimáticas foram encontradas para a enzima imobilizada comercial. Observou-se também que os diferentes suportes

provocavam mudanças distintas na estrutura enzimática, resultando em atividades e seletividades diferentes, a depender do suporte empregado.

MILETIĆ *et al.* (2009) imobilizaram a lipase CAL-B em um suporte polimérico macroporoso de poli(glicidil-metacrilato-co-etilenoglicol-dimetacrilato) e avaliaram o efeito do diâmetro médio de poro e do tamanho das partículas poliméricas no processo de adsorção da lipase durante a imobilização e nas atividades de hidrólise e de síntese da enzima imobilizada. Os suportes foram produzidos por uma reação de polimerização em suspensão. A maior parte das enzimas se ligou covalentemente ao suporte. Observou-se que, com a diminuição do tamanho de partículas, ocorria uma diminuição na quantidade de proteína adsorvida e o aumento na atividade de hidrólise e de síntese do biocatalisador. Além disso, o aumento no diâmetro de poro conduziu a maiores atividades de hidrólise e de síntese. Comportamento semelhante foi observado com o aumento da área.

MILETIĆ *et al.* (2010) estudaram a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) em nanopartículas de poliestireno, sintetizadas a partir de um processo de nanoprecipitação. Foi avaliada a influência do pH da solução tampão utilizada no processo de imobilização, tanto no rendimento de imobilização quanto na atividade da enzima imobilizada. Por meio deste estudo, foi possível observar que a maior atividade de hidrólise da enzima imobilizada foi encontrada quando a imobilização foi conduzida em condições próximas ao ponto isoelétrico da enzima.

A imobilização da CAL-B em suportes macroporosos poliméricos, o poli((glicidil-metacrilato)-co-(etilenoglicol dimetacrilato)) e o poli((glicidil-metacrilato)-co-(etilenoglicoldimetacrilato)) modificado com glutaraldeído, foi realizada por MILETIĆ *et al.* (2011). Avaliou-se de que forma a imobilização enzimática afetava a área específica do suporte e o diâmetro médio de poro. Percebeu-se que a imobilização provocava modificações na estrutura porosa do suporte, apresentando efeitos que dependem da estrutura porosa utilizada.

HERNANDEZ *et al.* (2011) empregaram partículas poliméricas comerciais porosas à base de estireno-divinilbenzeno para imobilização da lipase CAL-B. Os suportes avaliados se mostraram bastante promissores, uma vez que a capacidade de adsorção de proteína foi elevada e as atividades das enzimas imobilizadas também foram expressivas, se comparadas a outros suportes comerciais.

BARBOSA *et al.* (2012) imobilizaram a lipase CAL-B em suportes de agarose (suporte à base de polissacarídeos) contendo glutaraldeído e grupamentos amina. Diversas condições de imobilização foram conduzidas, cada uma resultando em interações específicas entre a enzima e o suporte, como adsorção física, ligação covalente e ligação iônica. Foram obtidas atividades enzimáticas diferentes e enantiosseletividades distintas, a depender do biocatalisador utilizado.

É importante salientar que em todos os estudos mencionados, com exceção dos trabalhos realizados por CHEN *et al.* (2008) e MILETIĆ *et al.* (2009, 2010, 2011), não houve descrição sobre a forma como os suportes foram produzidos, sendo empregados suportes comerciais ou obtidos de terceiros, não havendo o detalhamento sobre o procedimento de síntese dos mesmos.

Outros estudos sobre imobilização enzimática foram realizados, envolvendo outros tipos de lipases. OLIVEIRA *et al.* (2000) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* por adsorção física em um copolímero de estireno-divinilbenzeno. A área específica apresentada pelo suporte era baixa, inferior a 1m²/g. Foram encontradas atividades de hidrólise e de esterificação expressivas para as enzimas imobilizadas.

GUISAN *et al.* (2001) propuseram uma nova forma de realizar a imobilização de enzimas. Inicialmente uma lipase foi adsorvida a um suporte hidrofóbico. Em seguida, a enzima imobilizada foi colocada na presença de um polímero, polietilenoimina. A lipase foi, então, recoberta por uma camada polimérica. Dessa forma, foi possível minimizar as interações diretas entre a enzima e os solventes orgânicos presentes no meio reacional, aumentando, assim, a atividade e estabilidade enzimática.

HUANG *et al.* (2001) sintetizaram partículas poliméricas porosas de poli(estireno-divinilbenzeno) e as empregaram na imobilização da lipase de *Candida rugosa*. A metodologia adotada envolveu diferentes etapas reacionais, de forma a possibilitar a produção das partículas com estrutura porosa.

YASUDA *et al.* (2002) estudaram a síntese de partículas poliméricas anfifílicas e as empregaram para imobilização da lipase de *Rhizopus delemar*. As partículas foram sintetizadas em duas etapas. Primeiramente houve uma reação por dispersão, levando à síntese de sementes de poliestireno. Em seguida, as sementes foram utilizadas em uma reação de polimerização com a presença de diversos monômeros. Reações sequenciais foram conduzidas até a obtenção final das partículas anfifílicas.

CUNHA *et al.* (2008) estudaram a imobilização da lipase de *Yarrowia lipolytica* em diferentes suportes poliméricos, como octil–agarose, MANAE–agarose (suportes à base de polissacarídeos funcionalizados com grupamentos octila e monoaminoetil-N-aminoetila, respectivamente) e octadecil–Sepabeads (suporte à base de polimetacrilato funcionalizado com grupamentos octadecila). Foram obtidos rendimentos de imobilização elevados para as diferentes imobilizações realizadas. No entanto, as retenções de atividade foram baixas. A imobilização realizada no suporte octadecil–Sepabeads resultou em um biocatalisador com apreciável estabilidade a variações de temperatura e pH, estabilidades estas não observadas nos demais biocatalisadores.

Um estudo sobre a imobilização da lipase do fungo *Penicillium simplicissimum* a suportes hidrofóbicos (butil, fenil-, e octil-agarose) (suportes à base de polissacarídeos funcionalizados com grupamentos butila, fenila e octila, respectivamente) foi realizado por CUNHA *et al.* (2009). Foram observados fenômenos de hiperativação das enzimas imobilizadas. A estabilidade térmica, especificidade e enantiosseletividade apresentadas pelos biocatalisadores produzidos variaram, a depender do suporte utilizado na etapa de imobilização.

SAY *et al.* (2011) sintetizaram nanopartículas poliméricas contendo lipase, a partir de um processo de polimerização em microemulsão. A imobilização foi conduzida ao longo da própria polimerização.

Microesferas magnéticas, hidrofóbicas e porosas foram sintetizadas por TAI *et al.* (2012). Essas partículas foram produzidas a partir de uma reação de copolimerização em suspensão de metacrilato de metila e divinilbenzeno, na presença de magnetita recoberta por ácido oleico. Desta forma, partículas casca-núcleo foram produzidas e utilizadas na imobilização da lipase de *Arthrobacter sp.* Foram reportados bons resultados de estabilidade e o reuso da enzima imobilizada.

LIU *et al.* (2013) desenvolveram diferentes partículas poliméricas porosas contendo grupos epóxi e as utilizaram na imobilização da lipase de *Candida lipolytica*, por ligação covalente. As partículas poliméricas foram sintetizadas a partir da reação de polimerização em suspensão. Os autores reportaram que, a depender do terceiro monômero empregado no processo de copolimerização, os parâmetros de imobilização (como quantidade de enzima adsorvida e atividade da enzima imobilizada) são alterados.

Alguns trabalhos envolveram a imobilização de outras enzimas a suportes poliméricos. TAO e FURUSAKI (1995) sintetizaram partículas poliméricas porosas a partir de uma reação de polimerização em suspensão de acroleína, acetato de vinila e divinilbenzeno, na presença de tolueno. Em seguida, foi feita a funcionalização das partículas poliméricas, realizando-se a introdução de grupamentos amino e hidroxil na superfície. Foi então estudada a imobilização de uma protease no suporte desenvolvido.

AKGÖL *et al.* (2009) desenvolveram suportes de poli(HEMA-MAH) (poli(2-hidroxiethyl metacrilato-co-N-metacrilóil-L-histidinametiléster) a partir da técnica de polimerização em emulsão livre de surfactante. As partículas foram, então, empregadas na imobilização da enzima catalase, sendo reportado o aumento da estabilidade à estocagem.

ILLANES *et al.* (2010) estudaram os efeitos do tamanho de partícula e carga inicial de enzima em um processo de imobilização por ligação covalente. A enzima empregada no estudo foi a Penicilina G acilase e o suporte utilizado foi o glioxil-agarose. Percebeu-se que limitações de transferência de massa eram relevantes no caso de imobilizações realizadas em matrizes do tipo gel.

DURMAZ *et al.* (2011) sintetizaram microesferas de polidivinilbenzeno reticulado, empregado como núcleo, que apresentavam em suas superfícies cadeias poliméricas hidrofílicas e / ou hidrofóbicas. Essas partículas foram utilizadas para a imobilização por adsorção de uma oxidase de *Agaricus bisporus*, com bons resultados.

2.2.3.2. Suportes Poliméricos Sintetizados a partir do Processo em Suspensão-Emulsão Empregados na Imobilização Enzimática

Em função da síntese de partículas porosas com auxílio de uma tecnologia desenvolvida no próprio laboratório (EngePol, Laboratório de Engenharia de Polimerização), vislumbrou-se a possível aplicação de tais partículas na imobilização de enzimas. Assim, PINTO *et al.* (2004a) mostraram que as partículas com morfologia casca-núcleo produzidas por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) poderiam ser usadas para a suportação de células e de compostos enzimáticos.

FIGUEIREDO *et al.* (2005) utilizou os suportes porosos com morfologia casca-núcleo para adsorção da lisozima, com o objetivo de efetuar a separação desta proteína do meio. Empregou também hidroxiapatita e um copolímero de estireno e

divinilbenzeno para o mesmo fim. Foi observada a adsorção de maior quantidade de enzima na hidroxiapatita; no entanto, o suporte com morfologia casca-núcleo também foi considerado promissor, em função da elevada quantidade de proteína adsorvida, dos baixos custos de produção e da facilidade de funcionalização.

BESTETI (2011) sintetizou diferentes suportes poliméricos com morfologia casca-núcleo, a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Em uma segunda etapa, BESTETI (2011) e CUNHA (2011) empregaram tais suportes para imobilização da lipase comercial CAL-B. Avaliaram também as atividades hidrolíticas e de esterificação dos biocatalisadores produzidos. Os resultados encontrados para as atividades de hidrólise e de esterificação das enzimas imobilizadas foram próximos aos da enzima comercial, Novozyme® 435, e superiores aos obtidos nas imobilizações realizadas no suporte comercial Accurel® MP1000. Para exemplificar, as atividades de esterificação obtidas foram, Novozyme® 435 (2167 U/g_{enzimo}) e partículas com núcleo e casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (1809 U/g_{enzimo}), suporte que resultou no biocatalisador com melhor desempenho.

É importante salientar que a utilização de processos em suspensão e emulsão simultâneas são muito vantajosos na síntese de suportes enzimáticos, pois permite a produção de partículas porosas e possibilita a alteração dos componentes da casca de forma a intensificar a interação entre a enzima e o suporte, a depender das características intrínsecas de cada enzima que deve ser imobilizada. Além disso, as partículas são sintetizadas em uma única etapa, não havendo a necessidade de etapas adicionais de funcionalização do suporte (BESTETI, 2011).

2.3. Comentários Finais

Por tudo o que foi apresentado, pode-se perceber que muitos trabalhos envolvem processos de imobilização enzimática. No entanto, pouquíssimos trabalhos foram realizados na área específica de Engenharia de Suportes, objetivando a produção de um determinado suporte com características específicas para a imobilização de um determinado tipo de enzima de interesse. Apenas dois trabalhos sintetizaram as partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo para imobilização da lipase B de *Candida Antarctica* (CHEN *et al.*, 2008; BESTETI, 2011). Dessa forma, o presente estudo visa a compreender como os parâmetros de imobilização são afetados pelas

propriedades morfológicas dos suportes poliméricos e a entender a influência das variáveis operacionais sobre a morfologia das partículas, sintetizadas pela técnica de polimerização descrita. Assim, objetiva-se estudar a forma como este sistema polimérico deve ser conduzido para gerar, ao final do processo, biocatalisadores com atividades e parâmetros de imobilização desejados.

Neste estudo, foram desenvolvidos suportes à base de poliestireno. Como já mencionado, este polímero apresenta elevada hidrofobicidade, boa resistência mecânica e possui pronunciada reatividade. A enzima utilizada foi a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). Esta enzima exibe elevada enantiosseletividade e catalisa uma série de reações, envolvendo substratos diversos. Em função disso, a CAL-B é muito empregada para a síntese de fármacos, em reações de esterificação e transesterificação, para a síntese de biodiesel e em sínteses químicas diversas, como na polimerização da caprolactona (GONZÁLEZ-SABÍN, 2002; LUTZ, 2004; RANGANATHAN *et al.*, 2008; VAIDYA *et al.*, 2008; MILETIĆ *et al.*, 2009; CUNHA, 2011). Esta enzima, como a maior parte das lipases, apresenta elevada afinidade por suportes hidrofóbicos (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998).

Com base na discussão apresentada, pode-se concluir que o estudo do processo de imobilização da enzima CAL-B em suportes porosos à base de estireno e preparados por polimerização em suspensão e emulsão simultâneas constitui um tema de significativa relevância tecnológica e científica.

Capítulo III

Materiais e Metodologias

O objetivo deste capítulo é descrever os procedimentos de síntese e de caracterização das partículas poliméricas casca-núcleo sintetizadas. Serão descritos também o procedimento de imobilização enzimática realizado e as análises executadas. Dessa forma, o capítulo será subdividido em três seções principais. Na seção 3.1 são relatados os materiais utilizados, a metodologia e as técnicas de caracterização envolvidas na etapa de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas do estireno. Na seção 3.2, que envolve a etapa de imobilização da lipase B de *Candida Antarctica*, são apresentados os materiais empregados e a metodologia utilizada no processo de imobilização. Discutem-se também as análises realizadas com o propósito de determinar a cinética de imobilização e o desempenho dos biocatalisadores produzidos. Na seção 3.3 é apresentado o Software utilizado para a determinação dos modelos empíricos que serão apresentados no Capítulo 04.

3.1. Etapa de Polimerização em Suspensão-Emulsão Simultâneas

3.1.1. Materiais

A unidade experimental utilizada para a síntese das partículas com morfologia casca-núcleo é ilustrada na Figura 3.1. Os constituintes da unidade experimental utilizada foram:

1. Proveta de 100 ml, que permitiu um controle mais preciso da vazão de monômero ao longo da alimentação. A alimentação foi constituída apenas por monômero, estireno;
2. Suporte com garra para estabilizar a corrente de alimentação;
3. Bomba dosadora (Prominent, modelo GALA1000SST000UA002100) com cabeça

de bombeamento de aço inox;

4. Reator de vidro borossilicato encamisado e com capacidade de 1 l. A tampa do reator é de aço inox e possui orifícios para alimentação de monômero, introdução do agitador mecânico e do condensador de refluxo. Uma braçadeira de aço também é utilizada para fixar a tampa ao reator;

5. Agitador mecânico de aço inox (IKA RW20 digital) com haste reta e impelidor com seis pás dispostas verticalmente;

6. Condensador de refluxo do tipo serpentina, usado para recuperar o monômero e a água volatilizados ao longo da reação;

7. Banho de aquecimento com recirculação e com controle de temperatura (Thermo Scientific, modelo Haake Phoenix II C35P), usado para controlar a temperatura do reator. O fluido de circulação usado foi água destilada;

8. Banho de resfriamento com recirculação e com controlador de temperatura (Nova Ética, modelo 521-2D), cujo fluido de circulação era constituído por uma mistura de água destilada e etilenoglicol (proporção de 1:1).

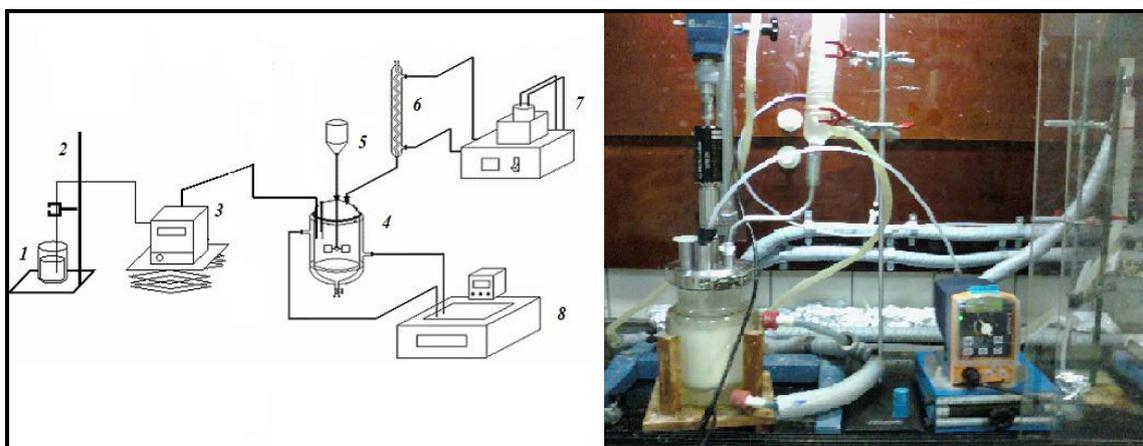


Figura 3.1. Unidade experimental utilizada para produção das partículas com morfologia casca-núcleo.

São apresentados a seguir os materiais utilizados no preparo das soluções empregadas na reação, usados na etapa de lavagem e filtração das partículas produzidas e empregados no preparo das amostras a serem caracterizadas. Os equipamentos utilizados diretamente na etapa de caracterização serão descritos na Seção 3.1.3.

1. Placa de agitação (IKAMAG®, C-MAG HS 7) para homogeneização das soluções;

2. Balanças (BEL Engineering, modelo M214A, pesagem máxima de 220 g, com precisão de 0,0001 g; BEL Engineering, modelo Mark3100, pesagem máxima de 3100 g, com precisão de 0,01 g) para determinação da massa dos reagentes e das amostras para análise;
3. Coletor de amostras, constituído por uma agulha e um eppendorf preso a sua ponta, utilizado para recolher as alíquotas ao longo da polimerização;
4. Kitasato com funil, com capacidade de 1000 ml, empregado na etapa de filtração;
5. Papel de filtro (Qualy, gramatura 80, maioria dos poros com diâmetro de 14 μm), utilizado na etapa de filtração;
6. Dewar e trap, empregados durante a etapa de filtração;
7. Bomba de vácuo (Quimis, modelo Q355D2) utilizada na etapa de filtração;
8. Estufa de circulação (Quimis, modelo Q314 M-122) para a secagem das alíquotas retiradas ao longo da reação e do sobrenadante, possibilitando o cálculo da conversão e do teor de sólidos;
9. Estufa a vácuo da fabricante Precision, para a secagem das partículas casca-núcleo sintetizadas, das alíquotas retiradas ao longo da reação e do sobrenadante;
10. *Shaker* (IKA, HS250 basic), para solubilização das partículas casca-núcleo e das partículas emulsificadas no solvente empregado na análise de GPC.
11. Cubeta de vidro de 4ml, para as análises de distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante.

Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho, incluindo a etapa de caracterização, foram utilizados como recebido, sem nenhuma etapa de purificação.

1. Estireno (S), fornecido pela Sigma Aldrich com pureza mínima de 99%, sendo empregado como monômero nas reações de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas;
2. Peróxido de benzoíla P.S. (BPO), fornecido pela Vetec Química Fina com teor máximo de umidade de 25%, sendo utilizado como iniciador na etapa de polimerização em suspensão;
3. Persulfato de Potássio P.A. ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$), fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%, sendo usado como iniciador na etapa de polimerização em emulsão;

4. Lauril sulfato de sódio (SLS), fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 90%, sendo utilizado como emulsificante na etapa de polimerização em emulsão;
5. Bicarbonato de sódio (NaHCO_3), fornecido pela Proquimios com pureza mínima de 99,7%, sendo utilizado no preparo da solução tampão empregada na polimerização em emulsão;
6. Poli(álcool vinílico) P.S. (PVA), fornecido pela Vetec Química Fina com grau de hidrólise de (86,5-89,5)% e M_w de 78.000 g/mol, sendo usado como agente de suspensão na etapa de polimerização em suspensão;
7. Tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company Inc. com pureza mínima de 99,8%, sendo usado na análise de GPC como fase móvel e para solubilização das amostras;
8. Hidroquinona, fornecida pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%, sendo utilizada como inibidor da reação de polimerização, garantindo o término da reação após a retirada das alíquotas;
9. Água destilada, sendo empregada no preparo das soluções de PVA, $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, SLS e NaHCO_3 e sendo utilizada como fluido de troca térmica e na lavagem das partículas ao longo da etapa de filtração;
10. Etileno glicol Mono P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99,5%, empregado como fluido refrigerante no banho de resfriamento;
11. Tolueno P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99,5%, sendo usado na limpeza do reator e do impelidor ao final da reação;
12. Nitrogênio líquido, usado na análise de BET;
13. Gás nitrogênio, fornecido pela Air Products com pureza mínima de 99%, utilizado para manter a atmosfera inerte ao longo da análise de DSC.
14. Etanol P.A., fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99,8%, sendo utilizado na análise de determinação de tamanhos das partículas casca-núcleo.
15. Gás nitrogênio, utilizado na análise de BET, com pureza mínima de 99%.

3.1.2. Metodologia

As partículas porosas poliméricas foram sintetizadas por meio da técnica de polimerização em suspensão-emulsão simultâneas desenvolvida por LENZI (2002) e

LENZI *et al.* (2003). O procedimento empregado na realização de cada uma das reações é apresentado a seguir.

3.1.2.1. Etapa da Polimerização em Suspensão

Esta etapa envolve a reação em suspensão, ocorrendo a síntese do núcleo polimérico das partículas casca-núcleo. Segundo LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003), o grau de recobrimento das partículas está associado à conversão atingida pelo núcleo durante a etapa de suspensão. Dessa forma, como o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de suportes enzimáticos, optou-se por conduzir as reações em suspensão por 2 h, de forma a promover maior grau de recobrimento das partículas, resultando em partículas casca-núcleo mais porosas (BESTETI, 2009).

Inicialmente foram preparadas a solução de agente de suspensão e a solução aquosa de hidroquinona (pelo menos 12 horas antes do início da reação). A solução de hidroquina, após o preparo, foi mantida na geladeira até o momento da reação. A solução monomérica, constituída por monômero e iniciador, foi preparada apenas no momento da reação. As massas de cada um dos componentes envolvidos nesta etapa inicial da reação são apresentadas na Tabela 3.1. Todas as reações foram conduzidas em batelada na temperatura de 85°C com agitação de (1000 ± 50) rpm. As condições reacionais de referência foram estabelecidas em trabalhos anteriores (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003; BESTETI, 2009).

Inicialmente era adicionada ao reator a solução de PVA a 85°C. A agitação era iniciada e mantida em torno de 300 rpm. Durante o aquecimento da solução de PVA, era preparada a solução de monômero (estireno) e iniciador (BPO) a temperatura ambiente, de forma a evitar o início da polimerização. Após o preparo da solução monomérica, iniciava-se então a adição ao reator. A partir deste momento, a agitação era ajustada para o valor desejado e iniciava-se a reação de polimerização em suspensão.

Tabela 3.1. Massa de cada um dos componentes envolvidos na etapa de polimerização em suspensão.

Etapa de Suspensão						
Reação	Massa de Agente de Suspensão (PVA) (g)	Massa de Água (g)	Massa de Monômero (S) (g)	Massa de Iniciador (BPO) (g)	Massa de Hidroquinona (g)	Massa de Água no Preparo da Solução de Hidroquinona (g)
1 - 18	3,0	370,0	100,0	4,0	0,5	49,5

3.1.2.2. Etapa da Polimerização em Suspensão-Emulsão Simultâneas

Na etapa da polimerização em emulsão são geradas pequenas partículas que são capturadas pelo núcleo pegajoso produzido na suspensão, ocorrendo, então, a formação da casca porosa (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003). Nessa etapa, ambas as reações (suspensão e emulsão) são conduzidas no mesmo reator simultaneamente, sem qualquer etapa intermediária de separação. Como o presente trabalho tem por objetivo avaliar a influência de alguns parâmetros de operação, como vazão de alimentação de monômero, concentrações de iniciador e de emulsificante e quantidade de monômero alimentada na etapa de emulsão, em cada reação foi empregada uma massa específica de cada um desses reagentes mencionados. Na Tabela 3.2 são mostradas as massas de cada um dos componentes adicionados em cada uma das reações durante a etapa de emulsão. Todas as reações foram conduzidas a 85 °C e com a agitação de (1000±50) rpm, condições idênticas às empregadas na polimerização em suspensão. Vale ressaltar que esta etapa é conduzida em batelada alimentada, para evitar o descontrole térmico da reação e a aglomeração completa das partículas. A sequência de experimentos apresentada na Tabela 3.2 será discutida no Capítulo 04.

A solução de emulsificante era preparada juntamente com a solução de agente de suspensão, pelo menos oito horas antes de ser empregada na reação, de maneira a garantir a solubilização completa de todo o material sólido. Já as soluções tampão e de iniciador eram preparadas no momento em que a polimerização em suspensão era conduzida. A solubilização destes componentes ocorria por aproximadamente 30 min.

Tabela 3.2. Massa de cada um dos componentes envolvidos na etapa de polimerização em emulsão.

Etapa de Emulsão						
Reação	Massa de Monômero Carga Inicial (S) (g)	Massa de Monômero na Alimentação (S) (g)	Massa de Iniciador ($K_2S_2O_8$) (g)	Massa de Emulsificante (SLS) (g)	Massa de Bicarbonato ($NaHCO_3$) (g)	Massa de água destilada (g)
1	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
2	0	0	0	0	0	0
3	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
4	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
5	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
6	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
7	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
8	30,0	70,0	0,3	3,125	0,3	227,0
9	30,0	70,0	0,3	1,875	0,3	227,0
10	30,0	70,0	0,225	2,5	0,3	227,0
11	30,0	70,0	0,375	2,5	0,3	227,0
12	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
13	30,0	20,0	0,225	2,5	0,3	227,0
14	30,0	120,0	0,225	2,5	0,3	227,0
15	30,0	20,0	0,3	2,5	0,3	227,0
16	30,0	120,0	0,3	2,5	0,3	227,0
17	30,0	70,0	0,3	2,5	0,3	227,0
18	30,0	70,0	0,225	2,5	0,3	227,0

Assim, após as duas horas da reação em suspensão, eram adicionadas ao reator, nesta ordem, a solução de emulsificante (SLS), a solução tampão ($NaHCO_3$) e a água destilada. A solução tampão, como já mencionado, tem como objetivo conferir maior estabilidade à emulsão (LENZI, 2002). Já a água destilada tem por função completar o meio reacional, garantindo a dispersão das partículas poliméricas. Entre as adições de cada uma das soluções, respeitou-se sempre um intervalo de 2 min, de maneira a não provocar uma queda pronunciada da temperatura do meio reacional.

Após a adição da água, era adicionada ao reator uma carga inicial de estireno e, em seguida, a solução de iniciador ($K_2S_2O_8$). Neste momento, iniciava-se a alimentação de estireno, presente em uma proveta. Dessa forma, era possível exercer um controle mais preciso da vazão de alimentação. O momento em que a primeira gota de monômero desprendia-se da mangueira e atingia o reator era considerado como o início

da etapa de emulsão alimentada. A duração desta etapa variava, a depender da vazão de alimentação de monômero e da quantidade de monômero alimentada. Ao longo de toda a reação, a vazão nominal da bomba era alterada para estar o mais próximo possível do valor almejado. Ao terminar a alimentação de monômero, prosseguia-se com mais duas horas de emulsão, de maneira a garantir o recobrimento das partículas.

Terminada a reação de polimerização em suspensão-emulsão simultâneas, o sistema era resfriado, para inibir o prosseguimento da reação. Eram formadas, então, duas fases ao final do processo: decantado, constituído por partículas com morfologia casca-núcleo, que decantavam com o meio em repouso; e sobrenadante, formado pelas partículas emulsificadas que não foram capturadas pelo núcleo pegajoso e que permaneciam dispersas no sobrenadante. Esse látex foi recolhido para posterior análise das partículas ainda presentes em emulsão.

Seguia-se, então, com a etapa de filtração e lavagem das partículas casca-núcleo, ocorrendo a eliminação dos componentes do meio reacional ainda presentes na superfície das partículas. Por fim, o material polimérico era levado à estufa a vácuo, onde permanecia até a massa seca não apresentar variações expressivas, sendo, então, caracterizado e armazenado.

3.1.3. Caracterização das Partículas Poliméricas

Diversas análises foram realizadas com o objetivo de caracterizar as partículas casca-núcleo sintetizadas: Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC), Análise de Distribuição de Tamanhos de Partícula, Microscopia Óptica, Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e Análise de área específica, diâmetro médio de poro e volume específico de poros (BET). Todas as análises foram realizadas com as amostras secas. As partículas presentes no sobrenadante também foram caracterizadas: Análise de Distribuição de Tamanhos de Partícula, Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) e teor de sólidos. Foram realizadas também análises de conversão e rendimento das reações realizadas. Cada uma dessas técnicas será discutida a seguir.

3.1.2.1. Microscopia Óptica

As partículas poliméricas sintetizadas foram analisadas no Microscópio Óptico, possibilitando uma melhor observação da morfologia das partículas. O microscópio utilizado foi o microscópio ótico binocular (Nikon, modelo SMZ800, com capacidade de ampliação de 50 ×), com câmera digital (Nikon Coolpix 995) acoplada, que possibilita a ampliação e digitalização da imagem.

3.1.2.2. Microscopia Eletrônica de Varredura

Foi utilizado também o Microscópio Eletrônico de Varredura (Fei Company, modelo Quanta 200), operando com tensão máxima de 30 kV, alto vácuo e elétrons secundários. As fotomicrografias foram processadas em um analisador de imagens (Fei Company). Dessa forma, foi possível uma visualização ainda mais acurada das partículas sintetizadas, sendo viável a observação de detalhes da superfície, como os poros formados.

As amostras, antes de serem analisadas no microscópio, sofreram um tratamento de metalização que garantiu um recobrimento das partículas com ouro, sendo possível, então, a sua visualização no microscópio. As condições de operação para a aquisição das imagens, como tamanhos de “spot”, distância de trabalho (WD) e as ampliações das regiões fotografadas podem ser observadas na legenda das micrografias que serão apresentadas no Capítulo 04.

3.1.2.3. Cromatografia de Permeação em Gel

As partículas poliméricas, tanto as partículas casca-núcleo quanto as presentes no sobrenadante, também foram caracterizadas quanto à distribuição das massas molares e quanto às massas molares médias das cadeias poliméricas que as compunham. Para isso, foi utilizado o cromatógrafo (Viscotek, modelo GPC Max VE2001; com uma coluna linear KF-804L e uma coluna linear KF-805L, fornecidas pela Shodex, com tamanho máximo de poro de $1,5 \cdot 10^3 \text{ \AA}$ e $5 \cdot 10^3 \text{ \AA}$, e detector refratométrico Viscotek, modelo VE3580) operando a 40 °C. A fase móvel utilizada nas análises foi o solvente

tetrahidrofurano (THF). A calibração do equipamento foi realizada com padrões de poliestireno, com massas molares na faixa de (2340– $1,8 \times 10^6$) Da.

A técnica de cromatografia de permeação em gel (GPC) ou cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) é usada para determinar a distribuição de massas molares de polímeros e também os valores das massas molares médias. Essa análise envolve a separação do polímero nas diferentes frações de massas molares que o constituem. Inicialmente, o polímero é dissolvido em um determinado solvente, no qual deverá ser completamente solúvel. A solução polimérica é injetada em uma coluna recheada com gel poroso e as moléculas são, então, separadas de acordo com o volume hidrodinâmico que apresentam; ou seja, o tamanho efetivo das cadeias em uma solução. As moléculas maiores são eluídas primeiro, pois não conseguem penetrar nos poros da coluna. Contudo, as partículas menores conseguem penetrar nos inúmeros poros, havendo a necessidade de um maior volume de solvente para eluí-las.

A faixa de separação dos tamanhos das cadeias depende do tamanho dos poros da coluna recheada. Vale ressaltar também que a coluna e o recheio não devem interagir com o polímero e o solvente utilizados. Assim, a correta determinação das massas molares está relacionada com a seleção correta das colunas e dos solventes.

Para realização das análises de GPC, as partículas casca-núcleo produzidas foram pesadas (0,015g) em tubos de vidro apropriados, em que foram adicionados 3 ml de THF. Esses tubos devidamente vedados foram colocados em um *shaker*, para garantir a dissolução de todo o conteúdo polimérico. As partículas do sobrenadante foram gotejadas (15 gotas) no tubo de vidro, em que foram adicionados 3 ml de THF. Em seguida, foram colocadas em um banho contendo água a 40 °C, para facilitar a dissolução das partículas, e depois conduzidas ao *shaker*. Em algumas amostras de sobrenadante muito concentradas, foram adicionados 5 ml de solvente. Contudo, como todas as análises de GPC que serão apresentadas no próximo capítulo foram normalizadas (sinal normalizado entre 0 e 1), qualquer efeito de concentração na intensidade da resposta é anulado. Após a etapa de dissolução, prosseguia-se com a filtração das soluções, realizadas em membranas com diâmetro de poro de 0,45 µm. Por fim, aproximadamente de 300 µl de cada filtrado eram injetados no cromatógrafo.

3.1.2.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

Para determinar as temperaturas características das transições térmicas das partículas poliméricas produzidas foram realizadas análises de Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC). Essas análises foram realizadas em um equipamento da fabricante Perkin Elmer, modelo DSC 8500.

Quando uma substância sofre alguma transformação física ou química, ocorre liberação ou absorção de uma determinada quantidade de calor. A técnica de DSC mede, por meio de uma programação controlada de temperatura (aquecimento ou resfriamento), a energia envolvida na transformação.

Em uma curva de DSC típica de materiais poliméricos, três tipos básicos de transformações podem ser usualmente detectados: transformações endotérmicas (como a fusão), transformações exotérmicas (como a cristalização) e transições de segunda ordem (como a transição vítrea) (ODIAN, 2004). Essas temperaturas podem ser determinadas a partir de um processo de resfriamento e aquecimento. A temperatura de transição vítrea (T_g) é detectada quando as cadeias poliméricas adquirem a chamada mobilidade segmental, momento em que as cadeias começam a apresentar certa mobilidade. A temperatura de fusão (T_m) é associada à fusão de regiões cristalinas do polímero.

Para a realização das análises, aproximadamente 10 mg de cada amostra foram adicionados a cadinhos de alumínio que, em seguida, foram fechados e selados. Foi utilizado como referência um cadinho de alumínio vazio. Os termogramas foram obtidos do segundo ciclo de aquecimento/resfriamento na faixa de temperatura de 0 a 200 °C, usando uma taxa de resfriamento/aquecimento constante de 10°C/min sob atmosfera de nitrogênio. O primeiro ciclo teve como objetivo a padronização da história térmica das amostras.

3.1.2.5. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro, Volume Específico de Poros

Com o objetivo de determinar a área específica, diâmetro médio de poro e volume específico de poros das partículas casca-núcleo, foi utilizado um Analisador de

superfície de materiais (área específica, diâmetro médio de poro e volume específico de poros) empregando o modelo de Brunauer, Emmett e Teller (BET), para o cálculo de área, e o método de Barret, Joyner e Halenda (BJH) para a determinação da distribuição dos tamanhos e dos volumes de poro. Em função da dificuldade encontrada para realização de tal análise, as amostras foram distribuídas entre três laboratórios: um laboratório da Universidade Estadual do Rio de Janeiro (UERJ) (o equipamento utilizado foi fornecido pela Micrometics, modelo ASAP 2020), um laboratório da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) (o equipamento utilizado também foi fornecido pela Micrometics, modelo ASAP 2020) e um laboratório da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) (o equipamento utilizado foi fornecido pela Micrometics, modelo ASAP 2020V3 2H).

A técnica de BET é baseada na adsorção física de um gás sobre a superfície das partículas. O processo de adsorção é resultado das forças de interação entre as moléculas do gás e do sólido, interações fracas do tipo forças de van der Waals (TEIXEIRA, *et al.* 2001). Os gases mais empregados como adsorvatos são o nitrogênio e o argônio, por adsorverem sobre a superfície de qualquer sólido, independentemente da composição do mesmo.

Para avaliar a estrutura porosa de um material, a construção de uma isoterma de adsorção é importantíssima, uma vez que permite a obtenção de informações sobre a porosidade, a área e a distribuição de poros do material. A isoterma mostra a relação existente entre a quantidade de gás adsorvida ou dessorvida por um sólido em função da pressão relativa do gás, a uma temperatura constante. Utiliza-se, então, um modelo capaz de descrever de forma satisfatória a isoterma de adsorção física obtida (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Para sólidos mesoporosos (diâmetro de poro na faixa de 20-500 Å) e microporosos (diâmetro de poro abaixo de 20 Å), o modelo BET é adequado para descrever a isoterma encontrada (SALIS *et al.*, 2003).

A área específica é determinada a partir da quantidade de adsorvato necessária para a formação de uma monocamada sobre a superfície das partículas analisadas. A partir do método BJH, que se baseia na equação de Kelvin e considera o esvaziamento progressivo dos poros cheios de líquido com a queda da pressão, é possível determinar a distribuição dos diâmetros de poro e o volume específico de poros (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Para a realização da análise BET, inicialmente aproximadamente 1 g de cada amostra era pesado em um balão volumétrico. Em seguida, o balão era acoplado ao equipamento, sendo iniciada a etapa de pré-tratamento. Este tratamento é realizado a temperatura de até 60°C a vácuo, de forma a eliminar qualquer contaminante volátil que possa estar presente na superfície das partículas.

Após o pré-tratamento, cada material era novamente pesado, de forma a determinar a exata massa seca do polímero. Em seguida, o balão volumétrico era acoplado ao equipamento, sendo, então, resfriado com a utilização de um Dewar contendo N₂ líquido. Neste momento, o sistema de vácuo era ativado, seguido da injeção de gás N₂ para o interior do sistema, promovendo a adsorção do gás sobre a superfície das partículas. A duração desta etapa varia, a depender da área específica da massa polimérica. Por fim, com o auxílio de programas computacionais baseados no modelo e no método já detalhados, a área específica, o diâmetro médio de poro e o volume específico de poros eram determinados para cada uma das amostras produzidas.

3.1.2.6. Distribuição de Tamanhos de Partícula

Foi utilizado um analisador de tamanhos de partícula na faixa de (0,02 µm - 2000 µm) (fornecido pela empresa Malvern Instruments, modelo Master sizer Hydro 2000S), para a determinação da distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo produzidas. Esta técnica é baseada no espalhamento da luz provocado pela presença das partículas poliméricas. Assim, a partir da detecção dos raios espalhados, é possível obter informações sobre a distribuição de tamanhos das partículas.

As partículas com morfologia casca-núcleo eram colocadas em um compartimento do equipamento, contendo uma solução de água e etanol. A presença de um sistema de agitação garantia a dispersão e a homogeneização das partículas no meio. Com o auxílio de uma bomba, parte desta solução, contendo as partículas, era conduzida até o leitor. Os gráficos de distribuição eram, então, obtidos. As análises foram sempre realizadas em triplicata.

Na distribuição de tamanhos das partículas ainda presentes no sobrenadante ao final de cada reação, foi utilizado um analisador de tamanho de partículas na faixa de (0,3 nm - 10 µm) (fornecido pela Malvern Instruments, modelo Zetasizer Nano-ZS). Esta técnica é baseada no espalhamento de luz proporcionado pela difusão das

partículas que se movimentam sob movimento Browniano. Dessa forma, é possível determinar a distribuição de tamanhos de partícula a partir de relações matemáticas bem estabelecidas.

Uma gota de cada amostra, sem tratamento prévio, era adicionada a uma cubeta de vidro. A cubeta era preenchida com água destilada e microfiltrada e, por fim, inserida no equipamento, iniciando-se a análise. Os gráficos de distribuição eram, então, obtidos. As análises foram sempre realizadas em triplicata.

3.1.2.7. Determinação da Conversão, do Rendimento da Reação e do Teor de Sólidos

Com base em análises gravimétricas, era possível determinar o teor de sólidos no sobrenadante, o rendimento e a evolução das conversões em cada uma das reações.

Para realizar a análise cinética, foram retiradas alíquotas ao longo da reação. Essas amostras eram vertidas em uma espécie de copinho de alumínio, contendo aproximadamente 5 gotas de solução aquosa de hidroquinona (1% p/p) em seu interior. Em seguida, eram conduzidas à estufa de circulação a 40 °C ou a uma estufa a vácuo, onde permaneciam até apresentarem massas constantes. A conversão correspondente a cada tempo de amostragem era calculada a partir das equações apresentadas no Apêndice A, sendo possível, então, a realização da análise cinética de cada uma das reações.

O rendimento de cada reação foi calculado a partir da massa final de polímero obtida, após sua secagem completa, e a massa inicial de monômero empregada na reação. A Equação 3.1 era usada para o cálculo do rendimento.

Ao final de cada reação, aproximadamente 10 ml da solução do sobrenadante eram adicionados a um béquer contendo aproximadamente 10 gotas de solução de hidroquinona (1% p/p). Essas amostras também eram colocadas na estufa de circulação a 40 °C ou na estufa a vácuo, onde permaneciam até que as massas apresentassem valores constantes. Dessa forma, o teor de sólidos presente no sobrenadante de cada uma das reações pôde ser determinado a partir da Equação 3.2. Cada análise foi sempre realizada em triplicata.

$$r = \frac{m_{\text{polímero}}}{m_{\text{monômerosusp}} + m_{\text{monômeroemuls}}}$$

Equação 3.1. Cálculo do rendimento.

sendo: r , o rendimento; $m_{\text{polímero}}$, a massa de polímero seco obtida ao final da etapa de secagem; $m_{\text{monômerosusp}}$, a massa de monômero adicionada na etapa da suspensão; $m_{\text{monômeroemuls}}$, a massa total de monômero adicionada na etapa de emulsão.

$$TS = \frac{m_{\text{bsobsec}} - m_b - m_{\text{hid}}}{m_{\text{bsobumido}} - m_b - m_{\text{solhid}}}$$

Equação 3.2. Cálculo do teor de sólidos.

sendo: TS , o teor de sólidos; m_{bsobsec} , a massa do béquer, do sobrenadante seco e da hidroquinona contida na solução inibidora adicionada; $m_{\text{bsobumido}}$, a massa do béquer, contendo a solução aquosa de hidroquinona, e do sobrenadante úmido, retirado logo após a reação; m_{hid} , a massa de hidroquinona contida na solução aquosa; m_b , a massa do béquer; m_{solhid} , a massa adicionada da solução aquosa de hidroquinona.

3.2. Etapa de Imobilização Enzimática

3.2.1. Materiais

A imobilização enzimática foi realizada utilizando a unidade apresentada na Figura 3.2.

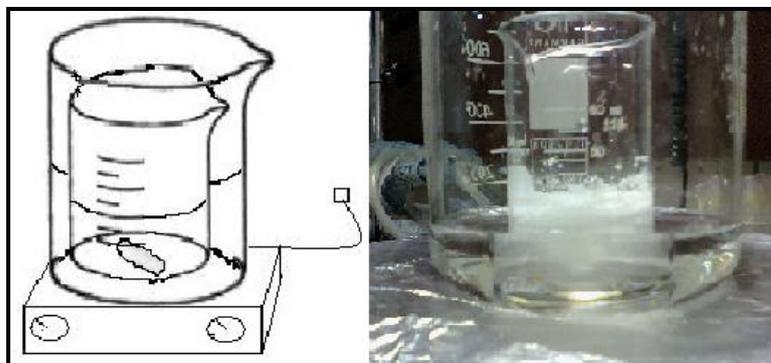


Figura 3.2. Unidade experimental utilizada para a imobilização enzimática.

Os constituintes da unidade experimental utilizada foram:

1. Um béquer de plástico de 600 ml, em que raspas de gelo eram adicionadas para manter a temperatura ao longo da imobilização em torno de 4°C;
2. Um béquer de 100 ml, em que foi realizada a imobilização;
3. Agitador magnético;
4. Placa de agitação (IKAMAG®, C-MAG HS 7), para manter a agitação do meio ao longo do processo de imobilização.

São apresentados a seguir os materiais utilizados na lavagem dos suportes, no preparo das soluções enzimáticas e na etapa de avaliação do desempenho das enzimas imobilizadas.

1. Placa de agitação (IKAMAG®, C-MAG HS 7), para homogeneização das soluções enzimática, tampão, de hidróxido de sódio e para realização das reações de esterificação e de hidrólise;
2. Kitasato com funil, com capacidade de 1000 ml, empregado na etapa da lavagem e filtração;
3. Papel de filtro (Qualy, gramatura 80, maioria dos poros com diâmetro de 14 µm), utilizado na etapa de lavagem e filtração dos suportes;
4. Dewar e trap, empregados durante a etapa de filtração;
5. Bomba de vácuo (Quimis, modelo Q355D2), para a lavagem e filtração dos suportes;
6. Espectrofotômetro, modelo UV-1800 fornecido pela empresa Shimadzu, utilizado para determinação das atividades de hidrólise;
7. Banho de aquecimento, com recirculação e controle de temperatura acoplado ao Espectrofotômetro, fornecido pela empresa Ética, modelo 521-2D, utilizado para manter a temperatura do espectrofotômetro a 30 °C, temperatura na qual foram realizadas as dosagens de atividade hidrolítica, e para manter a temperatura do meio reacional nas reações de hidrólise catalisadas pelo biocatalisador produzido;
8. Titulador automático, fornecido pela empresa Mettler Toledo, modelo G20, utilizado na determinação das atividades de esterificação das enzimas imobilizadas;
9. Dois reatores de vidro encamisados de 50 ml com tampa, onde foram realizadas as reações de esterificação;

10. Banho de aquecimento com recirculação e controle de temperatura acoplado aos reatores de vidro, fornecido pela empresa PolyScience, modelo 911, utilizado para manter a temperatura do meio reacional a 40 °C, temperatura na qual foram realizadas as reações de esterificação;
11. Cubeta de vidro de 4 ml, utilizada nas dosagens de atividade de hidrólise das enzimas na forma solúvel;
12. Cubeta de vidro de 1 ml, empregada nas dosagens de atividade hidrolítica dos biocatalisadores;
13. Frascos de vidro de 10 ml, onde foram realizadas as reações de hidrólise;
14. Espectrofotômetro, modelo Power Wave XS fornecido pela Bio Tek, utilizado para determinação da quantidade de proteína presente nas soluções enzimáticas;
15. Copos plásticos, utilizados nas dosagens de atividade de esterificação;
16. Dessecador, empregado na secagem das enzimas imobilizadas;
17. *Shaker* (IKA, HS250 basic), utilizado durante a imobilização enzimática entre os tempos de amostragem de 6 h e 25 h;
18. Kitasato com funil, com capacidade de 500 ml, empregado na etapa de filtração das enzimas imobilizadas;
19. Papel de filtro (Nalgon, gramatura 80, com porosidade de 3 µm), utilizado na etapa de filtração das enzimas imobilizadas;
20. Trap, empregado durante a etapa de filtração das enzimas imobilizadas;
21. Bomba de vácuo (ILMVAC GmbH) para a etapa de filtração das enzimas imobilizadas;
22. *Shaker* (IKA®, MS3 digital), para agitar as placas de acrílicos utilizadas nas dosagens de quantidade de proteína;
23. Balança analítica, fornecida de Shimadzu modelo AY220, com precisão de 0,0001g, para determinar as massas dos componentes envolvidos na etapa de imobilização.

Os reagentes utilizados nesta etapa do trabalho também foram utilizados como recebido, sem nenhuma etapa de purificação.

1. Água destilada empregada na lavagem dos suportes e na preparação das diferentes soluções;

2. Lipozyme® CALB L, Lipase B de *Candida Antarctica* (CAL-B), na forma solúvel, fornecida pela empresa Novozymes;
3. *p*-nitrofenil laurato, fornecido pela Fluka, com pureza mínima de 98%, utilizado como substrato para determinação das atividades hidrolíticas;
4. Acetonitrila, fornecida pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99,9%, grau UV/HPLC, utilizada para preparar a solução de substrato;
5. Dimetilsulfóxido (DMSO), fornecido pela Tedia Company Inc., com pureza mínima de 99,9%, grau UV/HPLC, também utilizado para preparar a solução de substrato;
6. Fosfato de Sódio Monobásico P.A., fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99%, utilizado para preparar as soluções de tampão fosfato 5 e 25 mM com pH=7;
7. Hidróxido de Sódio P.A., fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99%, utilizado para preparar as soluções aquosas de hidróxido de sódio usadas para ajustar o pH da solução tampão e como titulante no titulador;
8. Etanol P.A., fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99,8%, utilizado para lavar os suportes e como substrato nas reações de esterificação;
9. Ácido oleico P.S., fornecido pela Vetec Química Fina, utilizado como um dos reagentes nas reações de esterificação;
10. Suportes poliméricos de poliestireno sintetizados na primeira etapa do trabalho, utilizados para a imobilização enzimática;
11. Accurel® MP 1000, suporte polimérico à base de polipropileno, fornecido pela empresa Membrana GmbH, utilizado como referência para avaliar o desempenho dos suportes produzidos na primeira etapa. Este material será chamado em alguns itens do texto apenas de Accurel;
12. Reagente de Bradford, fornecido pela empresa Bio Rad, utilizado para determinação da quantidade de proteína presente nas soluções enzimáticas;
13. Raspas de gelo, para manter a temperatura das imobilizações em torno de 4 °C.
14. BSA (2 mg/ml), fornecida pela Bio Rad, utilizada como padrão para geração de uma curva de calibração empregada na análise proteica;
15. Acetona P.A., fornecida pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99,5%, utilizada como solvente nas dosagens de atividade de esterificação;

15. Biftalato de Potássio P.A., fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 99,5%, previamente desumidificado na estufa, utilizado para determinar a exata concentração da solução de hidróxido de sódio utilizada como titulante.

3.2.2. Metodologia

A técnica de imobilização empregada no presente trabalho e os cálculos envolvidos na determinação dos parâmetros de imobilização são descritos em alguns trabalhos presentes na literatura (CUNHA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009; BRANCO *et al.*, 2010; CUNHA, 2011). Com base nesses trabalhos existentes na literatura técnica, os procedimentos adotados em cada uma das imobilizações realizadas são apresentados a seguir.

A etapa de imobilização foi iniciada com a lavagem dos suportes. Assim, pesava-se um grama de cada um dos suportes em béquer e, em seguida, eram adicionados 10 ml de etanol a cada um. Após 30 min, o etanol era retirado com auxílio de pipeta Pauster e, em seguida, a cada suporte eram adicionados 10 ml de água destilada. Prosseguia-se com a lavagem com água destilada até a remoção total do álcool, garantida a partir da ausência do odor do etanol nas partículas. Por fim, os suportes eram lavados com solução tampão fosfato de sódio 5 mM, previamente preparada, e filtrados. As partículas poliméricas eram armazenadas em tubos tipo Falcon e mantidas na geladeira até o momento da imobilização. Esse procedimento de lavagem era realizado com o objetivo de facilitar a penetração da solução aquosa enzimática para o interior do suporte no momento da imobilização, diminuindo o grau de hidrofobicidade do mesmo.

A partir do estudo realizado por CUNHA (2011), percebeu-se que, com o aumento da atividade hidrolítica da solução enzimática inicial de aproximadamente 100 U/g_{suporte} para aproximadamente 200 U/g_{suporte}, ocorria uma queda pronunciada na retenção de atividade para as enzimas imobilizadas em poliestireno. Esse resultado pode ser explicado pela ocorrência do fenômeno de *overcrowding*, caracterizado pela formação de multicamadas de enzimas, ocorrendo a obstrução do sítio ativo de parte das enzimas adsorvidas em função das demais camadas enzimáticas. Isso pode explicar a queda da retenção de atividade observada (CUNHA, 2011).

Em função do fenômeno apresentado, foi determinado que todas as imobilizações seriam realizadas com uma atividade hidrolítica inicial de aproximadamente 100 U/g_{suporte}. Assim, o concentrado enzimático comercial foi dissolvido em solução tampão de fosfato de sódio 5mM, de maneira a obter uma solução enzimática com a atividade desejada. As imobilizações foram realizadas em meio com baixa força iônica (tampão fosfato de sódio 5mM e pH 7,0), pois foi notado que, sob baixa força iônica, a velocidade de imobilização de lipases é máxima (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 1998).

Em seguida, ao béquer já contendo o suporte de interesse, eram adicionados 10 ml do extrato proteico. Esse era considerado o início do processo de imobilização. O sistema era mantido sob agitação por 25 h. Passadas 6 h de imobilização a 4 °C sob agitação de aproximadamente 250 rpm, o sistema era retirado do banho de gelo e da placa de agitação e era conduzido à geladeira, onde era mantido em um *shaker* até completar 25 h de imobilização. A temperatura do sistema era mantida baixa para evitar uma possível desnaturação da enzima. Ao longo de cada uma das imobilizações, foram retiradas alíquotas (0, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 25 h) para dosagem da enzima que ainda permanecia na fase solúvel (ou seja, no sobrenadante). Cerca de 1 min antes da retirada das alíquotas, a agitação do sistema era desligada para garantir a decantação das partículas poliméricas, no caso das partículas de poliestireno, ou a flotação, no caso das partículas de Accurel® MP 1000.

Ao final das imobilizações, os biocatalisadores (como já mencionado, correspondente à enzima já imobilizada) eram lavados com água destilada e filtrados, objetivando a remoção de possíveis enzimas não adsorvidas, que pudessem estar presentes na superfície das partículas. Em seguida, os biocatalisadores eram conduzidos ao dessecador, onde permaneciam por aproximadamente uma semana, para garantir a total secagem das amostras. Após todas as etapas descritas, os biocatalisadores eram colocados na geladeira, onde permaneciam até a realização das caracterizações.

3.2.3. Avaliação do Desempenho dos Biocatalisadores Produzidos

As reações de hidrólise e de esterificação das enzimas imobilizadas eram realizadas de maneira a determinar as atividades catalíticas dos biocatalisadores produzidos, possibilitando uma melhor avaliação do desempenho dos mesmos. Foram

caracterizadas também as cinéticas de imobilização, realizadas de duas maneiras distintas: primeiramente, considerando a atividade de hidrólise da enzima ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização e, em seguida, a partir da quantidade de proteína ainda presente na forma solúvel. Assim, foi possível determinar os parâmetros de imobilização de cada uma das imobilizações realizadas, rendimento de imobilização e retenção de atividade.

3.2.3.1. Cinética de Imobilização Baseada na Atividade Hidrolítica

Como já mencionado, ao longo do processo de imobilização foram retiradas alíquotas do sobrenadante. Dessa forma, foi possível dosar a atividade de hidrólise da enzima ainda presente na forma solúvel. A atividade hidrolítica foi determinada a partir da reação de hidrólise do substrato *p*-nitrofenil laurato catalisada pela enzima solúvel. O produto da reação é o *p*-nitrofenol, composto com coloração amarela. Assim, pelo método espectrofotométrico, determinou-se a quantidade de produto formada; logo, a atividade da enzima solúvel.

Inicialmente, uma curva de calibração foi realizada, relacionando diferentes concentrações de *p*-nitro fenol em uma solução tampão 25 mM a 30 °C às absorvâncias observadas para $\lambda=412$ nm. Dessa forma, pôde-se encontrar o valor do fator “f” que correlaciona essas duas variáveis ($0,094 \mu\text{mol} \cdot (\text{Abs} \cdot \text{ml})^{-1}$), sendo este o valor utilizado em todos os cálculos relacionados à atividade hidrolítica da enzima (MANOEL, 2013).

A solução de substrato era preparada pesando-se 0,016g de *p*-nitrofenil laurato em um balão volumétrico, onde eram adicionados 10 ml de acetonitrila e 10 ml de dimetilsulfóxido. Para realizar a reação, eram adicionados em uma cubeta 2,2 ml de solução tampão fosfato de sódio (25 mM e pH=7,0) e 0,25 ml da solução de substrato. A cubeta era, então, acoplada ao espectrofotômetro, cujo banho já se encontrava na temperatura desejada de 30 °C. Formava-se, assim, a linha de base e, após aproximadamente 0,5 min, eram adicionados 0,05 ml da solução enzimática. As análises foram realizadas em duplicata ou triplicata, a depender do tempo de amostragem.

A evolução dinâmica de cada reação foi acompanhada a partir do gráfico de absorvância fornecido pelo espectrofotômetro. As leituras foram realizadas com $\lambda=412$ nm. A atividade hidrolítica das enzimas na forma solúvel foi determinada com auxílio da Equação 3.3. Vale salientar que 1 UI, Unidade Internacional, ou simplesmente 1 U, é

definida como a quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1,0 μmol de produto, no caso *p*-nitrofenol, por minuto nas condições operacionais descritas.

$$A = \frac{\left(\frac{Abs}{min}\right) * V_{final} * f}{V_{amostra}}$$

Equação 3.3. Cálculo da atividade hidrolítica da enzima solúvel.

sendo: A, a atividade hidrolítica (UI/ml), que pode ser obtida em (UI/g_{suporte}) caso o valor em (UI/ml) seja multiplicado por 10 (pois foram utilizados 10 ml de solução enzimática por grama de suporte a cada imobilização); V_{final}, o volume final do meio reacional (ml); f, fator obtido a partir da curva de calibração do *p*-nitro fenol em tampão 25 mM a 30 °C; V_{amostra}, volume de amostra enzimática retirado do sobrenadante (ml); (Abs/min), o coeficiente angular da reta obtida com o avanço da reação de hidrólise.

A partir da cinética de imobilização, era possível determinar um dos parâmetros de imobilização: o rendimento de imobilização. O cálculo efetuado é mostrado na Equação 3.4.

3.2.3.2. Atividade de Hidrólise do Biocatalisador

Após a imobilização, cada biocatalisador foi caracterizado quanto a sua atividade de hidrólise. As reações de hidrólise foram realizadas em batelada. Inicialmente, em cada frasco de vidro eram adicionados 9 ml da solução de tampão fosfato de sódio (25mM, pH=7,0). Em seguida, adicionava-se 1 ml da solução de *p*-nitrofenil laurato (substrato). Para iniciar a reação, adicionavam-se aproximadamente 10 mg da enzima imobilizada em cada um dos reatores. O sistema era mantido sob agitação a 30 °C. Ao longo da reação, eram retiradas alíquotas de um em um minuto, aproximadamente, até 8 minutos. Cada alíquota era colocada diretamente na cubeta de 1 ml e conduzida ao espectrofotômetro. As leituras eram realizadas com $\lambda=412\text{nm}$ a 30 °C. As reações de hidrólise foram sempre realizadas em duplicata. É importante salientar que uma unidade de atividade enzimática (1 UI ou 1 U) corresponde à quantidade de enzima que forma 1 μmol de *p*-nitrofenol por minuto nas condições

operacionais citadas. Vale destacar também que ao longo deste Capítulo e do Capítulo 04 serão utilizadas como unidade U/g_{suporte} (relacionada à atividade enzimática em 1g de suporte polimérico) e U/g_{enzimo} (relacionada à atividade enzimática de 1 g de biocatalisador, ou seja, suporte com enzima adsorvida).

Com auxílio da Equação 3.5, era possível determinar a atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas.

$$\eta = \frac{U_{teo} * 100}{U_e}; U_{teo} = U_e - U_s$$

Equação 3.4. Cálculo do rendimento de imobilização.

sendo: η , o rendimento de imobilização (%); U_{teo} , a atividade da enzima que foi adsorvida ao suporte (UI/g_{suporte}); U_e , a atividade da solução enzimática no início do processo de imobilização (UI/g_{suporte}); U_s , a atividade da enzima presente no sobrenadante ao final do processo de imobilização (UI/g_{suporte}).

$$U_{imohid} = \frac{\left(\frac{Abs}{min}\right) * V_{final} * f}{m_{amostra}}$$

Equação 3.5. Cálculo da atividade hidrolítica do biocatalisador.

sendo: U_{imohid} , a atividade hidrolítica do biocatalisador (UI/g_{enzimo}); V_{final} , o volume final do meio reacional (ml); f , fator obtido a partir da curva de calibração do *p*-nitro fenol em tampão 25 mM a 30 °C (valor de $0,094 \mu\text{mol} \cdot (\text{Abs} \cdot \text{ml})^{-1}$, como já mencionado); $m_{amostra}$, massa de enzima imobilizada (g); (Abs/min) , coeficiente angular da reta obtida com o avanço da reação hidrolítica.

O outro parâmetro de imobilização, retenção de atividade, também pôde ser determinado. O cálculo efetuado para caracterizar a retenção de atividade é mostrado na Equação 3.6.

$$R_a = \frac{U_{imohid} * 100}{U_{teo}}; U_{teo} = U_e - U_s$$

Equação 3.6. Cálculo da retenção de atividade.

sendo: R_a , a retenção de atividade (%); U_{imohid} , a atividade de hidrólise do biocatalisador (UI/g_{enzimo}); U_{teo} , a atividade teórica de enzima que ficou retida ao suporte, considerando a atividade da enzima solúvel no início do processo de imobilização e a atividade da enzima que ainda permanece na forma solúvel ao final do processo de imobilização (UI/g_{suporte}).

3.2.3.3. Atividade de Esterificação da Enzima Imobilizada

Os biocatalisadores também foram avaliados quanto à atividade de esterificação. Para realizar cada uma das reações de esterificação, foram utilizados como substrato 10,1 ml de ácido oleico e 1,9 ml de etanol. Os reagentes eram homogeneizados em um béquer e vertidos no reator encamisado, já com a temperatura estabilizada em 40 °C, temperatura na qual todas as reações foram conduzidas. Em seguida, eram adicionados aproximadamente 0,2 g do biocatalisador ao meio reacional. Esse era considerado o início da reação de esterificação. O sistema era tampado, para evitar qualquer perda de reagente por evaporação, e mantido sob agitação de aproximadamente 250 rpm. Ao longo das reações eram retiradas alíquotas de 100 µl (0, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min). A análise de cada ponto de amostragem foi sempre realizada em triplicata.

Cada alíquota retirada era adicionada a uma espécie de copo plástico, que já continha 40 ml de uma mistura (1:1) (v/v) de etanol e acetona. Em seguida, a mistura era conduzida ao titulador. Esses solventes são necessários para extrair o ácido oleico presente na mistura reacional, possibilitando a dosagem no titulador. O titulante empregado no titulador automático foi uma solução de hidróxido de sódio (0,02M).

Como o produto resultante da reação de esterificação é um éster, ao longo da reação catalisada pelo biocatalisador ocorre uma redução da acidez do meio reacional. Dessa forma, com o aumento do tempo de amostragem, ocorre uma diminuição na quantidade de hidróxido utilizada na titulação da amostra. Em função dessa redução, é possível determinar a atividade de esterificação da enzima imobilizada. Vale salientar

que uma unidade de atividade enzimática (1 UI ou 1 U) corresponde à quantidade de enzima que forma 1 μmol de oleato de etila (produto da reação de esterificação) por minuto nas condições operacionais apresentadas. Novamente será utilizada como unidade U/g_{enzimo} (relacionada à atividade enzimática de 1 g de biocatalisador, ou seja, de enzima imobilizada).

A equação empregada para o cálculo da atividade é apresentada na Equação 3.7.

$$U_{\text{imoester}} = \frac{(V_{\text{NaOH}0} - V_{\text{NaOH}t}) * C_{\text{NaOH}} * V_f * 1000}{V_e * t * m_{\text{enz}}}$$

Equação 3.7. Cálculo da atividade de esterificação da enzima imobilizada.

sendo: U_{imoester} , a atividade de esterificação da enzima imobilizada (UI/g_{enzimo}); $V_{\text{NaOH}0}$, o volume de titulante utilizado para titular a solução correspondente a alíquota de 0 min (ml); $V_{\text{NaOH}t}$, o volume de titulante utilizado para titular a solução correspondente a alíquota do tempo de amostragem t (ml); C_{NaOH} , a concentração real da solução de hidróxido de sódio após ser padronizada com biftalato de potássio (mol/l); V_f , volume final do meio reacional (ml); V_e , volume da alíquota retirada para titulação (ml); t, tempo de amostragem (min); m_{enz} , massa de biocatalisador utilizada na reação (g).

3.2.3.4. Cinética de Imobilização Baseada na Quantidade de Proteína

Como o interesse principal desta análise era apenas estabelecer uma comparação e confirmar os resultados já encontrados a partir da análise da atividade enzimática, foram analisados apenas três tempos de amostragem para uma mesma corrida de imobilização. A concentração de proteína presente nas alíquotas foi avaliada nos tempos (0 min, 6 h, 25 h) com auxílio do método de Bradford, utilizando a albumina de soro bovino (BSA) como padrão. A solução de Bradford foi obtida diretamente, sem haver nenhuma etapa de preparo da solução.

Inicialmente foi realizada uma curva de calibração, relacionando diferentes concentrações de proteína (foi utilizada a albumina de soro bovino, BSA, como padrão) às diferenças entre as absorvâncias das amostras e as do branco em $\lambda=595$ nm. O valor

encontrado para um grupo de reações realizadas (1-11) foi de 0,91 ((mg.ml⁻¹).Abs⁻¹) e o valor obtido para um segundo grupo (12-18) foi de 0,67 ((mg.ml⁻¹).Abs⁻¹).

Para a dosagem da concentração de proteína, eram utilizados 190 µL da solução de Bradford e 10 µL de cada amostra. A mistura era realizada em uma placa de acrílico que, em seguida, era conduzida ao espectrofotômetro, onde as leituras eram realizadas com λ=595 nm. Cada análise foi realizada em duplicata ou triplicata, a depender do tempo de amostragem analisado.

O cálculo empregado para determinação da quantidade de proteína presente em cada solução enzimática analisada é mostrado na Equação 3.8.

$$P = (Abs_a - Abs_b) * k$$

Equação 3.8. Cálculo da concentração de proteína ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização.

sendo: P, a concentração de proteína (mg/ml); Abs_a, valor da absorvância obtido para a amostra analisada; Abs_b, valor da absorvância obtido para o branco, constituído apenas por reagente de Bradford, sem a presença de amostra; k, fator obtido a partir da curva de calibração realizada, empregando concentrações conhecidas da proteína padrão, BSA.

Para saber a quantidade de proteína retida no suporte, é necessário calcular a diferença entre as concentrações de proteína presentes no sobrenadante nos tempos inicial e final da imobilização e, em seguida, multiplicar o valor encontrado por 10, uma vez que foram adicionados 10 ml de solução enzimática em 1 g de suporte polimérico em cada imobilização.

3.3. Análise Estatística

Todas as atividades de análise estatística e de desenvolvimento de modelos empíricos foram realizadas com auxílio do *Software Statistica* versão 7.0 desenvolvido pela Stat Soft Inc.

A matriz de correlação foi obtida a partir do programa citado, assim como os modelos que serão apresentados no Capítulo 04. A etapa de modelagem foi realizada de forma iterativa. Inicialmente eram elaborados modelos. Caso o coeficiente de correlação

entre os dados experimentais e o modelo fosse insatisfatório (abaixo de 0,7), o modelo era descartado. Assim, novos modelos eram propostos até que fossem encontrados coeficientes de correlação mais próximos de 1. A partir do modelo selecionado, os parâmetros não significativos (que apresentavam valores de *p-level* acima de 0,05) eram progressivamente descartados, do menos significativo para o mais significativo. Então, novamente o coeficiente de correlação entre os dados experimentais e o novo modelo era calculado. Caso tivesse ocorrido uma queda pronunciada no valor do coeficiente de correlação, o parâmetro era novamente adicionado ao modelo. Caso a queda observada não tivesse sido pronunciada, o parâmetro era descartado definitivamente. Dessa forma, o objetivo principal com a modelagem foi a obtenção de modelos capazes de descrever de forma satisfatória o sistema (coeficiente de correlação mais próximo possível de 1) com o menor número possível de parâmetros.

Capítulo IV

Resultados e Discussão

O objetivo do presente capítulo é caracterizar e analisar a morfologia das partículas poliméricas casca-núcleo e avaliar os efeitos das variáveis operacionais sobre a morfologia de tais partículas. Foram analisados, em seguida, o efeito da porosidade e da área específica das partículas nos parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização e retenção de atividade. Assim, o presente capítulo é dividido em duas seções principais. A primeira seção engloba um primeiro bloco de experimentos, a partir do qual foi possível fazer o desenvolvimento de um modelo empírico capaz de descrever as atividades de hidrólise e de esterificação como função da morfologia dos suportes produzidos. Na segunda seção é apresentado um segundo bloco de experimentos, cujo objetivo foi avaliar o efeito de mais uma variável de preparo, a quantidade de monômero alimentada na etapa de polimerização, e validar os modelos desenvolvidos a partir do primeiro bloco experimental.

4.1. Primeiro Bloco Experimental

O primeiro bloco de experimentos foi traçado com o objetivo de avaliar a influência da vazão de monômero, da concentração de iniciador e da concentração de emulsificante, variáveis envolvidas na etapa de polimerização, sobre a porosidade e a área específica dos suportes poliméricos produzidos. Em seguida, o objetivo perseguido era de analisar o efeito das propriedades morfológicas das partículas nos parâmetros de imobilização.

A vazão de alimentação foi escolhida como uma das variáveis a ser estudada, pois apresenta uma relação direta com a quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo, em função de modificar o tempo de recobrimento e a concentração de partículas formadas na emulsão. As massas de iniciador e emulsificante podem interferir no

tamanho e número das partículas emulsificadas, o que pode afetar as propriedades das partículas casca-núcleo.

4.1.1. Influência de Variáveis Operacionais nas Propriedades das Partículas Poliméricas

Foram realizadas inicialmente 12 reações, para avaliar os efeitos das variáveis operacionais investigadas sobre a morfologia das partículas poliméricas. As condições nas quais cada reação foi conduzida são apresentadas na Tabela 4.1.

O plano experimental foi estabelecido, usando como referência a condição operacional padrão definida por BESTETI (2011) para produzir suportes enzimáticos à base de poliestireno. As vazões de alimentação foram variadas de forma a estabelecer uma janela operacional viável para a preparação das partículas, já que vazões muito baixas reduzem a eficiência do recobrimento (o núcleo fica muito rígido ou praticamente não são geradas partículas em emulsão) e vazões muito altas provocam aglomerações descontroladas. Foi analisado também o emprego de uma vazão que oscilasse (com aumentos e diminuições sucessivas) ao longo de toda a alimentação, buscando avaliar se perturbações impostas ao sistema durante a alimentação provocariam alguma modificação na morfologia das partículas produzidas, vazão esta mencionada no texto como “Vazão Flutuante”. As concentrações de iniciador e emulsificante foram perturbadas para cima e para baixo em torno do ponto de referência.

Os erros¹ da Tabela 4.1 foram calculados com dados de aferição das reações que possuíam o mesmo valor nominal para uma determinada variável, sendo por isso admitido constantes no plano experimental. Pode-se observar que um bloco de reações foi conduzido variando-se a vazão, enquanto em outro bloco de reações foi feita a alteração da quantidade de iniciador e da quantidade de emulsificante. Apesar de cada variável apresentar uma variância intrínseca associada, foi admitido em todas as análises

¹ O erro experimental associado a cada uma das variáveis, mostrado na Tabela 4.1 e nas demais tabelas e gráficos que serão apresentadas ao longo do capítulo, foi calculado a partir da multiplicação do desvio padrão (encontrado para cada um dos conjuntos de dados que apresentavam mesmo valor nominal) por dois, uma vez que foram consideradas distribuições normais com 95 % de confiança para os erros experimentais.

numéricas realizadas que as variáveis de entrada não apresentam erros. Esta consideração é pertinente, uma vez que o desvio padrão relacionado a cada medida de entrada é muito pequeno.

Tabela 4.1. Valor real das variáveis operacionais nas diferentes reações realizadas.

Reação	Legenda	Vazão (V) (l/h)	Quantidade de Emulsificante (ME) (g)	Quantidade de Iniciador (MI) (g)
1	Vazão Flutuante ²	Flutuante	2,503±0,006	0,304±0,005
2	Núcleo	-	-	-
3	V=0,035 l/h	0,035±0,004	2,508±0,006	0,308±0,005
4	V=0,039 l/h	0,039±0,004	2,501±0,006	0,307±0,005
5	V=0,071 l/h	0,071±0,004	2,507±0,006	0,300±0,005
6	V=0,127 l/h	0,127±0,004	2,502±0,006	0,305±0,005
7	V=0,082 l/h	0,082±0,004	2,506±0,006	0,302±0,005
8	+25% Emulsificante	0,039±0,004	3,126±0,006	0,300±0,005
9	-25% Emulsificante	0,034±0,004	1,875±0,006	0,304±0,005
10	-25% Iniciador	0,035±0,004	2,502±0,006	0,225±0,005
11	+25% Iniciador	0,037±0,004	2,500±0,006	0,376±0,005
12	V=0,017 l/h	0,017±0,004	2,504±0,006	0,301±0,005

Após a secagem completa do material produzido, foi calculado o rendimento associado a cada uma das reações, como mostrado na Figura 4.1. Observa-se que cada uma das variáveis afeta de forma significativa o rendimento da reação, sendo esse um dos fatores a serem considerados no momento de selecionar as condições operacionais mais adequadas para preparação dos suportes.

Analisando-se a Figura 4.1, percebe-se que o aumento da vazão de alimentação provoca uma queda no rendimento reacional, muito provavelmente em função do menor tempo para o recobrimento do núcleo pela concentração muito maior de partículas formadas na etapa de emulsão. Na reação 06, na qual foi empregada a maior vazão de alimentação de monômero, ocorreu o descontrole da reação, não sendo possível a obtenção de partículas individualizadas, mas de grandes aglomerados poliméricos, como ilustrado na Figura 4.2. Esse resultado é muito importante porque confirma a

² No experimento 01, a vazão denominada de “Vazão Flutuante” oscilou durante toda a reação (entre 0,02 l/h e 0,12 l/h, aproximadamente) apresentando um valor médio de 0,026 l/h. Como o tempo de alimentação foi extenso, reduziu-se o tempo da emulsão para 1 h.

existência de uma janela operacional bem definida para condução da reação, já mencionada por BESTETI (2011).

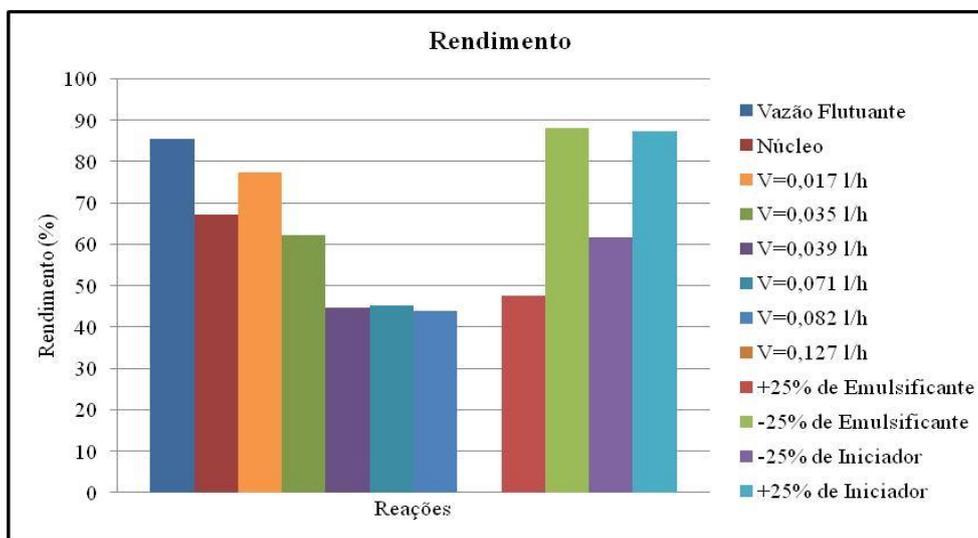


Figura 4.1. Rendimento correspondente a cada uma das reações realizadas no primeiro bloco de experimentos.

Segundo ODIAN (2004), o aumento na quantidade de emulsificante provoca um aumento da estabilidade das micelas e partículas poliméricas produzidas na emulsão. Assim, quanto maior a quantidade de emulsificante presente no meio, maior número de micelas nucleadas e menores são as partículas formadas (HARKINS, 1945a, 1945b, 1947). Dessa forma, como pode ser observado na Figura 4.1, o aumento na quantidade de emulsificante provoca uma queda no rendimento reacional, muito provavelmente em função da maior quantidade de partículas pequenas e estáveis que são formadas na etapa de emulsão. Assim, obtém-se maior quantidade de látex ao final da reação e, conseqüentemente, ocorre maior perda na etapa da filtração.

O aumento na quantidade de iniciador em uma reação de polimerização gera uma maior concentração de radicais livres no meio (ODIAN, 2004). Então, pode-se perceber que o aumento da concentração de iniciador na etapa de emulsão provoca um aumento do rendimento reacional provavelmente por causa da maior quantidade de polímero formado e maior aceleração da reação.



Figura 4.2. Grandes aglomerados gerados na reação em foi empregada uma vazão de 0,127 l/h.

É muito importante obter dados cinéticos ao longo das reações para acompanhar a evolução das variáveis ao longo do tempo. Por isso, a análise cinética das diferentes corridas realizadas no grupo de reações em que houve variação da vazão é apresentada na Figura 4.3. Observa-se que as diferentes reações apresentam conversões similares na etapa de suspensão, em torno de (70 - 75)%, a depender da reação. A reação em que houve a formação apenas de núcleos poliméricos, a conversão encontrada foi de 70%. Esses resultados são similares aos encontrados por BESTETI (2009) e já poderiam ser esperados, uma vez que as variáveis analisadas não afetam a etapa de suspensão.

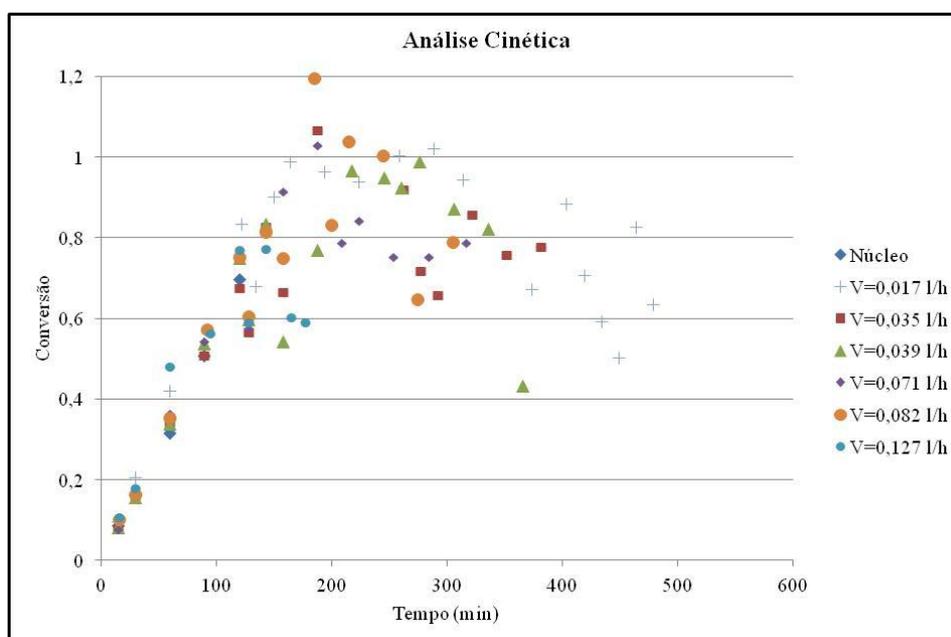


Figura 4.3. Análise cinética das conversões de monômero nas reações realizadas, avaliando o efeito da vazão.

No entanto, ao observar a Figura 4.3, percebe-se que após o início da etapa de emulsão alimentada, as conversões obtidas passam a oscilar expressivamente. Isso ocorre por conta de dois motivos. Em primeiro lugar, os mecanismos de transferência de massa são complexos e dependem das taxas de aglomeração. Em segundo lugar, aumenta nessa fase a dificuldade para retirar as alíquotas com as amostras. Ao longo da alimentação, o recobrimento das partículas começa a ocorrer, havendo decantação das partículas maiores e formação de aglomerados. Dessa forma, não há uma homogeneidade no meio reacional no momento de retiradas das alíquotas, o que provoca flutuações nos valores das conversões. Esses resultados são apenas indicativos da maneira como as reações evoluem. Assim, a variável mais indicada para a comparação do desempenho entre as diferentes reações de polimerização casca-núcleo baseadas no sistema proposto é o rendimento reacional e não a conversão. Resultados similares foram encontrados quando as demais variáveis foram estudadas, as concentrações de iniciador e de emulsificante, não sendo, por isso, apresentadas no presente Capítulo, sendo mostradas no Apêndice A. É importante perceber que a tendência de queda da conversão com o tempo na segunda etapa do processo reflete apenas os problemas de amostragem.

Outro parâmetro avaliado é o teor de sólidos encontrado no sobrenadante ao final de cada reação. O teor de sólidos indica a quantidade de partículas que não foram capturadas pelo núcleo e que permaneceram dispersas no sobrenadante. Assim, quanto maior o teor de sólidos, mais partículas permaneceram em emulsão, em função de uma menor eficiência do recobrimento do núcleo pelas partículas ou em função de uma maior quantidade de partículas geradas na etapa de emulsão. Essa variável também foi determinada com o objetivo de aprimorar o entendimento mecanístico desse complexo sistema de polimerização. A Figura 4.4 ilustra a influência de cada uma das variáveis no teor de sólidos.

Observa-se que o aumento da vazão provoca um aumento no teor de sólidos presentes no sobrenadante, muito provavelmente em função do menor tempo para o recobrimento do núcleo pelas partículas emulsificadas e formação de maior quantidade de partículas na emulsão, comportamento também observado a partir da análise do rendimento. Portanto, a redução do rendimento está associada à maior quantidade de sólidos na emulsão e não a redução da conversão do monômero. A diminuição do teor de emulsificante provoca uma queda pronunciada no teor de sólidos, pois maior é a

instabilidade da emulsão, provocando uma maior aglomeração das partículas e a consequente queda no teor de partículas em emulsão. O aumento na quantidade de iniciador provoca uma leve queda no teor de sólidos, muito provavelmente em função da maior quantidade de polímero e de uma maior aglomeração das partículas emulsificadas ao núcleo. É possível perceber que todas as reações que apresentaram uma queda pronunciada no teor de sólidos apresentaram também um aumento no rendimento reacional, muito provavelmente em função de um maior recobrimento do núcleo pelas partículas formadas em emulsão.

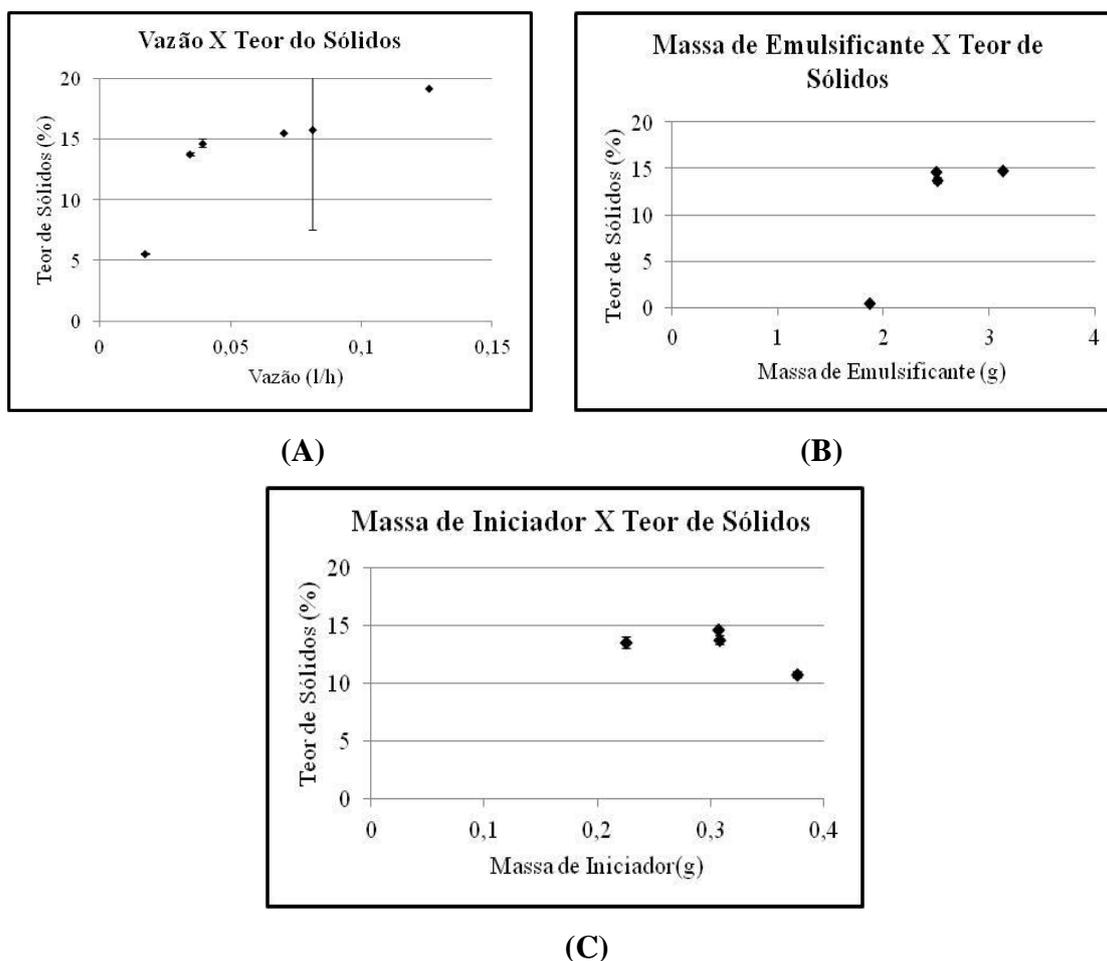


Figura 4.4. Influência de variáveis operacionais no teor de sólidos presentes no sobrenadante das diferentes reações: **(A)** vazão, **(B)** quantidade de emulsificante, **(C)** quantidade de iniciador.

4.1.1.1. Distribuições de Massas Molares

Com o objetivo de compreender a forma como cada uma das variáveis operacionais afeta a reação em suspensão-emulsão simultâneas, as distribuições das massas molares, tanto das partículas do sobrenadante quanto das partículas casca-núcleo, foram analisadas. Na Figura 4.5 são apresentadas as distribuições de massas molares das partículas do sobrenadante. Percebe-se que as distribuições de massas molares das diferentes partículas emulsificadas são muito semelhantes. Isso provavelmente indica que a história das partículas emulsificadas é muito parecida. Numa emulsão clássica, as massas molares dependem da relação existente entre as taxas de iniciação e quantidade de partículas emulsificadas. Em geral, quanto maiores as taxas de iniciação e menores as concentrações de partículas emulsificadas, menores as massas molares. Dessa forma, para as faixas estudadas, as variáveis operacionais investigadas não afetam as massas molares de maneira significativa. Pode-se destacar, contudo, a reação na qual foi empregada uma vazão flutuante e a reação que continha menos emulsificante. Estas reações levaram a um alargamento das distribuições de massas molares. O ombro formado em altas massa molares é característico das emulsões e pode atestar a menor eficiência de captura das partículas emulsificadas ou um atraso do processo de captura, por conta da menor concentração de partículas formadas.

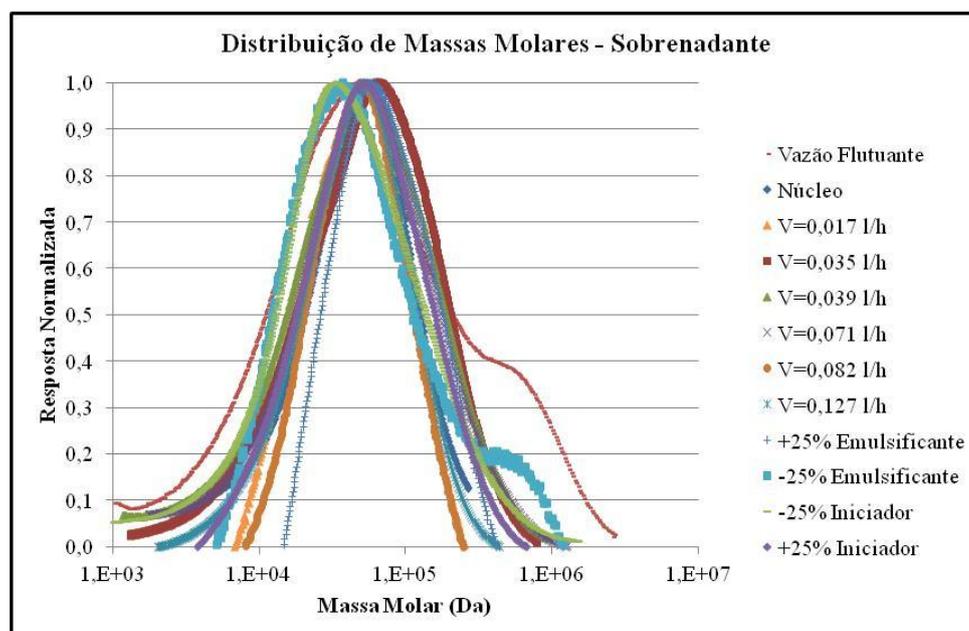


Figura 4.5. Distribuições de massas molares das partículas presentes no sobrenadante.

A Tabela 4.2 apresenta as massas molares ponderais médias (Mn e Mw) das partículas emulsificadas produzidas, acompanhadas pelos respectivos índices de polidispersão. Pode-se notar que as massas molares ponderais médias (Mw) são semelhantes, assim como os índices de polidispersão, excetuando-se as reações 01 e 09 já discutidas. Isso reforça a ideia de que existe forte interação entre as grandes e as pequenas partículas presentes no meio de reação. Contudo, mesmo para as duas reações citadas, o valor da massa ponderal média (Mn) não é muito alterado, em função da larga distribuição observada. Os resultados obtidos também são similares aos encontrados por BESTETI (2009). No entanto, vale salientar que esses valores são inferiores aos encontrados para uma reação em emulsão típica, pois a maior parte das partículas emulsificadas foram capturadas pelo núcleo, de maneira que a reação prossegue em condições similares à da polimerização em suspensão, restando apenas polímeros residuais no látex final. No entanto, as reações 01 e 09 apresentam maiores massas molares acompanhadas por índices de polidispersão mais elevados, em função do maior tempo que as partículas permaneceram em emulsão, em função de um atraso do início do processo de captura.

Tabela 4.2. Valores das massas molares ponderais médias (Mn e Mw) e valores dos índices de polidispersão (IP) das partículas do sobrenadante relativos a cada uma das reações do primeiro bloco experimental.

Reação	Mw (Da)	Mn (Da)	IP (-)
1	12,0E+04	2,0E+04	6,0
2	5,6E+04	3,5E+04	1,6
3	7,6E+04	2,9E+04	2,6
4	7,7E+04	2,7E+04	2,8
5	7,7E+04	3,2E+04	2,4
6	5,7E+04	2,8E+04	2,0
7	6,0E+04	2,8E+04	2,1
8	8,3E+04	3,2E+04	2,6
9	11,0E+04	2,2E+04	4,9
10	6,2E+04	2,3E+04	2,7
11	6,4E+04	2,4E+04	2,7
12	5,3E+04	2,3E+04	2,3

A análise de distribuição de massas molares foi realizada para as partículas casca-núcleo obtidas ao final de cada reação, como pode ser observado na Figura 4.6. Observa-se que as distribuições das massas molares das partículas sintetizadas são semelhantes às obtidas para as partículas do sobrenadante. Essa análise corrobora a teoria desenvolvida por LENZI (2002) sobre a formação das partículas casca-núcleo a partir do recobrimento do núcleo pelas partículas emulsificadas. O núcleo, sintetizado a partir da reação em suspensão, apresenta menores massas molares e distribuição de massas molares mais estreita. No entanto, com o depósito de partículas emulsificadas sobre ele, as distribuições de massa molar sofrem um alargamento e são levemente deslocadas para valores maiores. As distribuições são também similares entre si, com exceção da reação em que a vazão flutuou e da reação conduzida com menos emulsificante (reações 01 e 09, respectivamente), nas quais massas molares mais elevadas foram detectadas, como já foi observado nas análises das partículas do sobrenadante. Esse comportamento bimodal apresentado pelas partículas casca-núcleo resultantes das reações 01 e 09 também foi observado por BETETI (2009) e por LENZI (2002). Esse comportamento compartimentalizado é geralmente observado quando não há uma interação significativa entre as duas fases (partículas em emulsão e em suspensão). Assim, as partículas em emulsão, que apresentam maiores massas molares, continuam a exibi-las, não havendo a perda do caráter compartimentalizado em função da sua deposição sobre o núcleo, partícula resultante da suspensão.

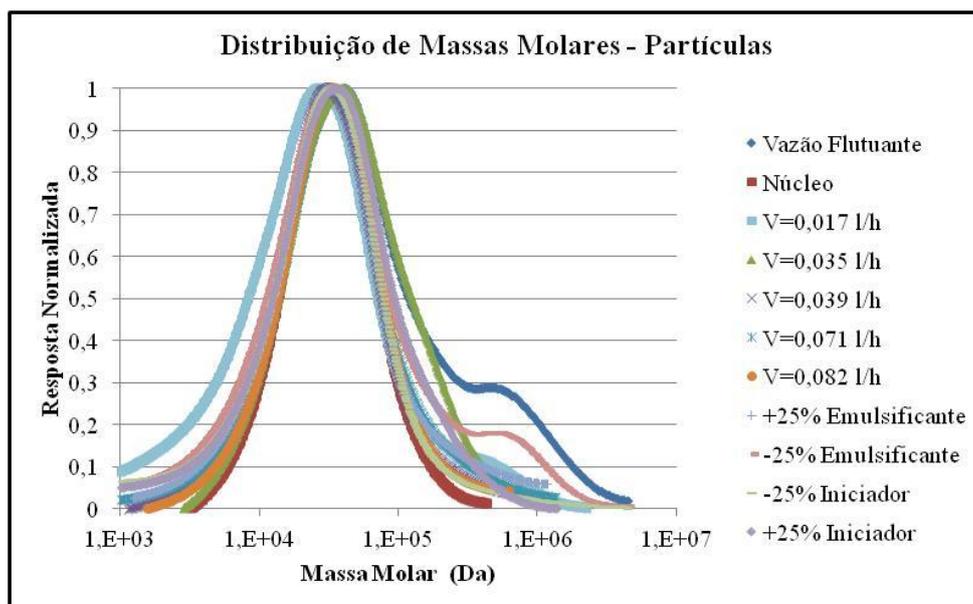


Figura 4.6. Distribuições de massas molares das partículas casca-núcleo.

A Tabela 4.3 apresenta as massas molares ponderais médias (Mn e Mw) das partículas casca-núcleo produzidas, acompanhadas pelos índices de polidispersão. Pode-se notar que as massas molares ponderais médias (Mw) também são semelhantes, assim como os índices de polidispersão, excetuando-se novamente as reações 01 e 09, que apresentam maiores massas molares e índices de polidispersão. Novamente, os valores das massas molares ponderais (Mn) são próximos, incluindo os valores das reações 01 e 09. Muito provavelmente, para estas reações, apesar da alteração dos valores de Mw, as distribuições são largas, não havendo modificações expressivas em Mn. Um aumento no índice de polidispersão também é observado para a reação 12, provavelmente em função de uma menor formação de partículas em emulsão.

Tabela 4.3. Valores das massas molares ponderais médias (Mn e Mw) e valores dos índices de polidispersão (IP) relativos a cada uma das partículas casca-núcleo produzidas a partir das reações do primeiro bloco experimental.

Reação	Mw (Da)	Mn (Da)	IP (-)
1	1,2E+05	2,2E+04	5,6
2	3,9E+04	2,1E+04	1,9
3	5,9E+04	2,2E+04	2,6
4	4,2E+04	1,8E+04	2,3
5	4,8E+04	2,0E+04	2,5
6	-	-	-
7	4,1E+04	1,9E+04	2,2
8	4,5E+04	1,8E+04	2,5
9	8,0E+04	1,6E+04	4,9
10	4,7E+04	1,8E+04	2,6
11	5,3E+04	2,0E+04	2,6
12	5,2E+04	1,3E+04	4,0

A partir da análise da Figura 4.7, é possível perceber que há uma correlação forte entre as massas molares ponderais médias (Mw) das partículas emulsificadas e das partículas casca-núcleo. Essa relação é decorrente da deposição das partículas da emulsão sobre o núcleo, como mencionado anteriormente. Esses dados mostram, uma vez mais, a forte interação entre as diferentes fases, como imaginado por LENZI (2002). A correlação é tão forte que parece lícito admitir que parte das partículas emulsificadas

tenha depositado sobre as partículas do núcleo e se desprendido, sob ação do campo de cisalhamento do vaso de reação.

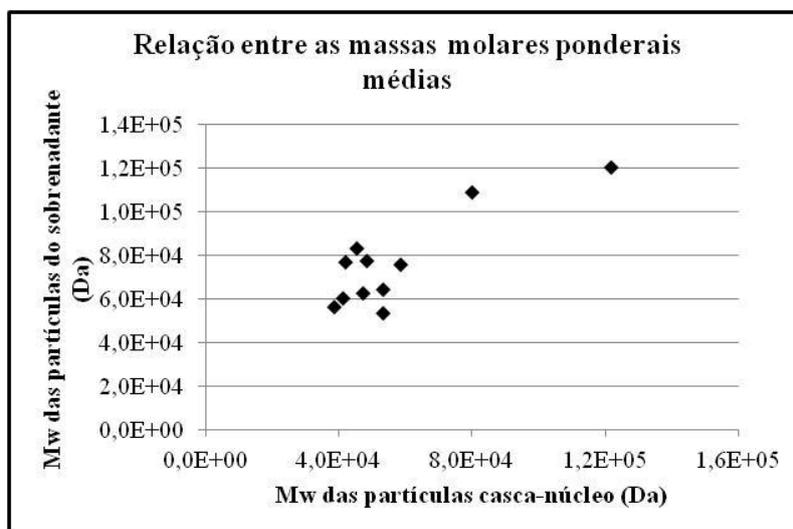


Figura 4.7. Relação entre as massas molares ponderais médias (Mw) das partículas emulsificadas e das partículas casca-núcleo.

4.1.1.2. Temperaturas de Transição Vítrea

As partículas casca-núcleo foram caracterizadas quanto a suas temperaturas de transição vítrea (T_g), apresentadas na Tabela 4.4. Nota-se que as temperaturas de transição vítrea das partículas produzidas são muito próximas independentemente da reação que as originou. Cada uma das curvas de DSC obtidas são mostrada no Apêndice B.

A partir dos resultados apresentados, é possível concluir que a estrutura das cadeias poliméricas são semelhantes, apesar das alterações realizadas nas variáveis operacionais. Esses valores também são similares aos observados por BESTETI (2009). Além disso, sabe-se que a T_g se aproxima assintoticamente de um valor limite, à medida que a massa molar aumenta (FOX e FLORY, 1950). Portanto, também é lícito admitir que a T_g é essencialmente constante porque as massa molares são suficientemente altas.

Tabela 4.4. Valores das temperaturas de transição vítrea das partículas produzidas.

Reação	Tg (°C)	Referência Apêndice B
1	102,7	Figura B.1
2	98,5	Figura B.2
3	97,6	Figura B.3
4	97,8	Figura B.4
5	98,5	Figura B.5
6	-	-
7	97,1	Figura B.6
8	99,4	Figura B.7
9	100,3	Figura B.8
10	98,9	Figura B.9
11	98,4	Figura B.10
12	100,1	Figura B.11

4.1.1.3. Morfologia das Partículas Poliméricas

Os materiais obtidos ao final de cada uma das reações foram caracterizados quanto à morfologia por eles apresentada. Dessa forma, uma série de análises foi realizada de maneira a obter informações sobre a distribuição dos tamanhos de partícula, a área específica, o diâmetro médio de poros e o volume específico dos poros. As partículas foram caracterizadas também a partir de microscopia eletrônica de varredura e microscopia óptica. Assim, os efeitos de cada uma das variáveis estudadas na morfologia das partículas casca-núcleo puderam ser analisados.

A Figura 4.8 ilustra a morfologia do núcleo produzido na etapa de suspensão a partir das análises de microscopia óptica e microscopia de varredura. Pode-se perceber que sua superfície é esférica e lisa. Na Figura 4.9 é possível visualizar as micrografias das partículas com morfologia casca-núcleo. As partículas são maiores e apresentam superfície irregular e repleta de reentrâncias (os poros).

Na Figura 4.10 é possível observar os poros formados na superfície das partículas e também os aglomerados formados em algumas reações. A partir das análises de microscopia não é possível obter informações conclusivas sobre o efeito de cada uma das variáveis operacionais na morfologia, mas é possível observar que as partículas casca-núcleo formadas apresentam estrutura porosa e morfologia complexa.

Além disso, é possível observar que a casca é formada pela aglomeração de pequenas partículas e que muitas partículas resultam da aglomeração de vários núcleos.

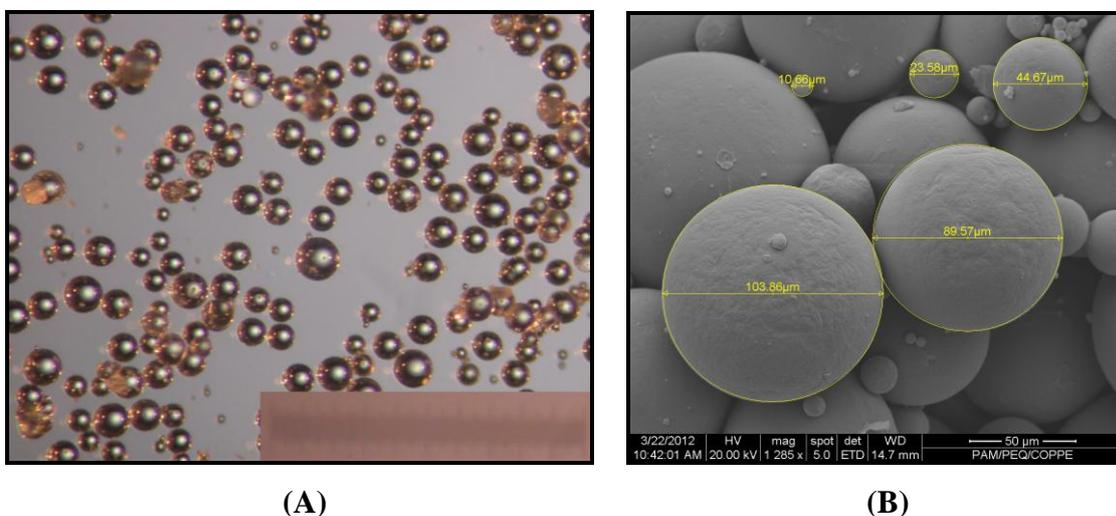


Figura 4.8. Morfologia do núcleo polimérico produzido: **(A)** microscopia óptica, **(B)** microscopia eletrônica de varredura. A régua possui comprimento de 1000 μm.

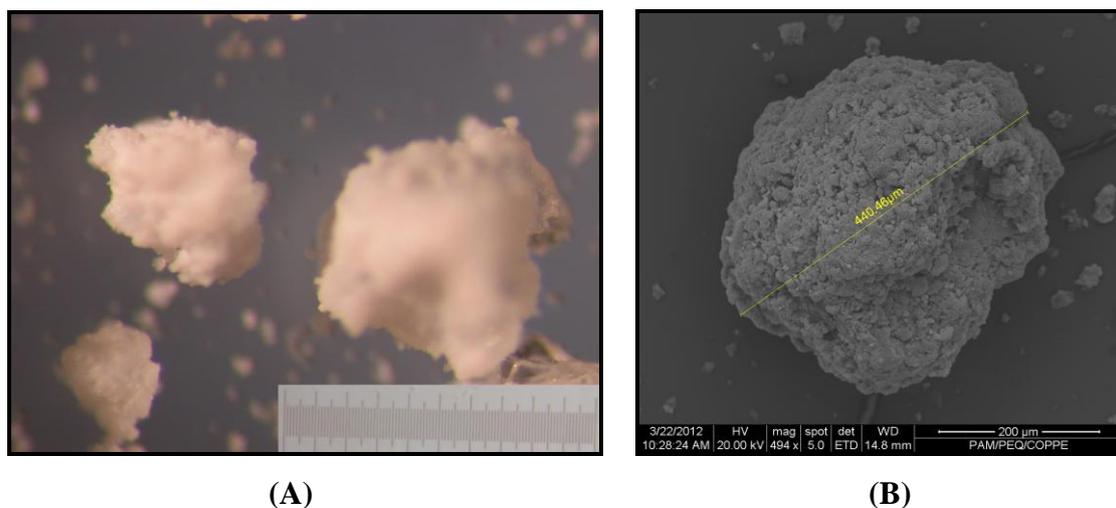
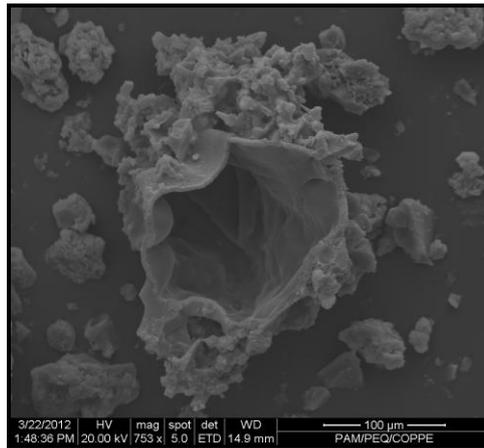
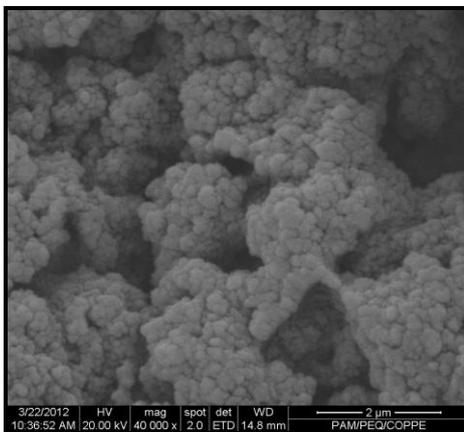


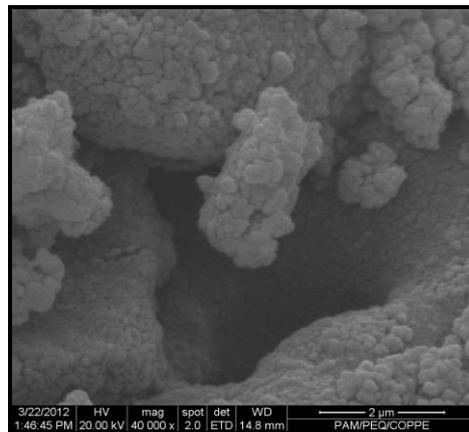
Figura 4.9. Morfologia das partículas poliméricas produzidas a partir da reação em que a vazão flutuou: **(A)** microscopia óptica, **(B)** microscopia eletrônica de varredura. A régua possui comprimento de 1000 μm.



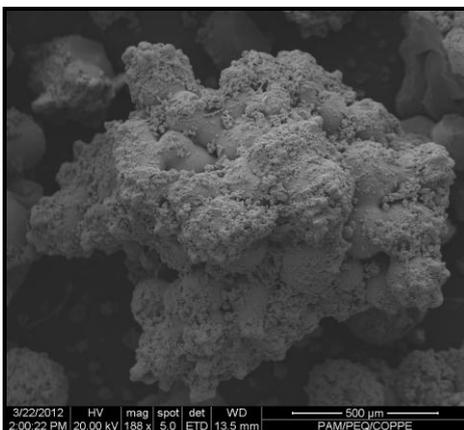
(A)



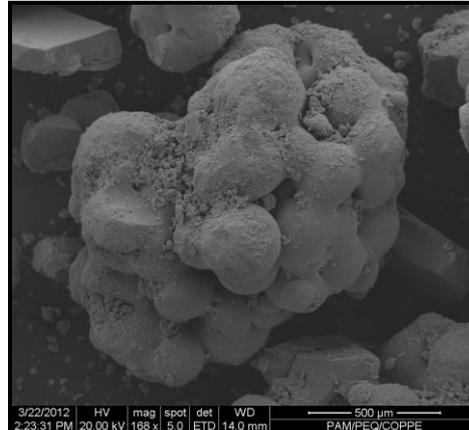
(B)



(C)



(D)



(E)

Figura 4.10. Partículas casca-núcleo produzidas: (A) uma casca vazia, produzida a partir da reação em $V=0,035$ l/h; (B) reentrâncias formadas na superfície das partículas na reação em que a vazão flutuou; (C) poros presentes nas partículas na reação em que $V=0,035$ l/h; (D) aglomerados formados na reação em que $V=0,039$ l/h; (E) aglomerados formados na reação em que $V=0,082$ l/h.

4.1.1.3.1. Distribuição de Tamanhos de Partícula

Como já foi mencionado, as partículas da emulsão recobrem os núcleos gerados na suspensão, conferindo a estes porosidade. Percebeu-se, então, que o diâmetro das partículas da emulsão poderiam afetar a área e a porosidade das partículas casca-núcleo produzidas. Assim, ao longo do trabalho foram avaliados os efeitos de cada uma das variáveis operacionais sobre a distribuição de tamanhos das partículas emulsificadas.

Na Figura 4.11 é mostrado o efeito da vazão de alimentação na distribuição de tamanhos das partículas do látex. Nota-se que o aumento da vazão aparentemente não afeta a distribuição de tamanhos das partículas emulsificadas, o que reforça a ideia de que as histórias das partículas sejam similares. Apenas a reação 03 apresenta um comportamento diferenciado que precisa ser posteriormente investigado. Como em todos os casos há uma população de diâmetros elevados no látex, próximos a 1 μm , é provável que essas partículas tenham se despreendido das cascas recém-formadas por conta do campo de cisalhamento do reator. O sobrenadante do núcleo apresenta distribuição mais estreita, com diâmetro médio em torno de 200 nm, porque contém apenas um resíduo do processo clássico em suspensão.

O efeito da quantidade de emulsificante também foi analisado e pode ser observado na Figura 4.12. A partir da análise anterior, percebeu-se que a reação 03 apresentou um comportamento diferenciado em relação às demais. Dessa forma, apenas a reação 04, que apresenta condições operacionais semelhantes às reações realizadas com menos e com mais emulsificante, diferindo apenas em relação à quantidade deste reagente, foi utilizada para efeito comparativo. Pode-se perceber que o aumento na quantidade de emulsificante provoca um deslocamento das curvas de distribuição de tamanhos para diâmetros menores. O aumento da fração de partículas menores ocorre em função de uma melhor estabilização e do aumento da quantidade das partículas formadas, como mencionado anteriormente.

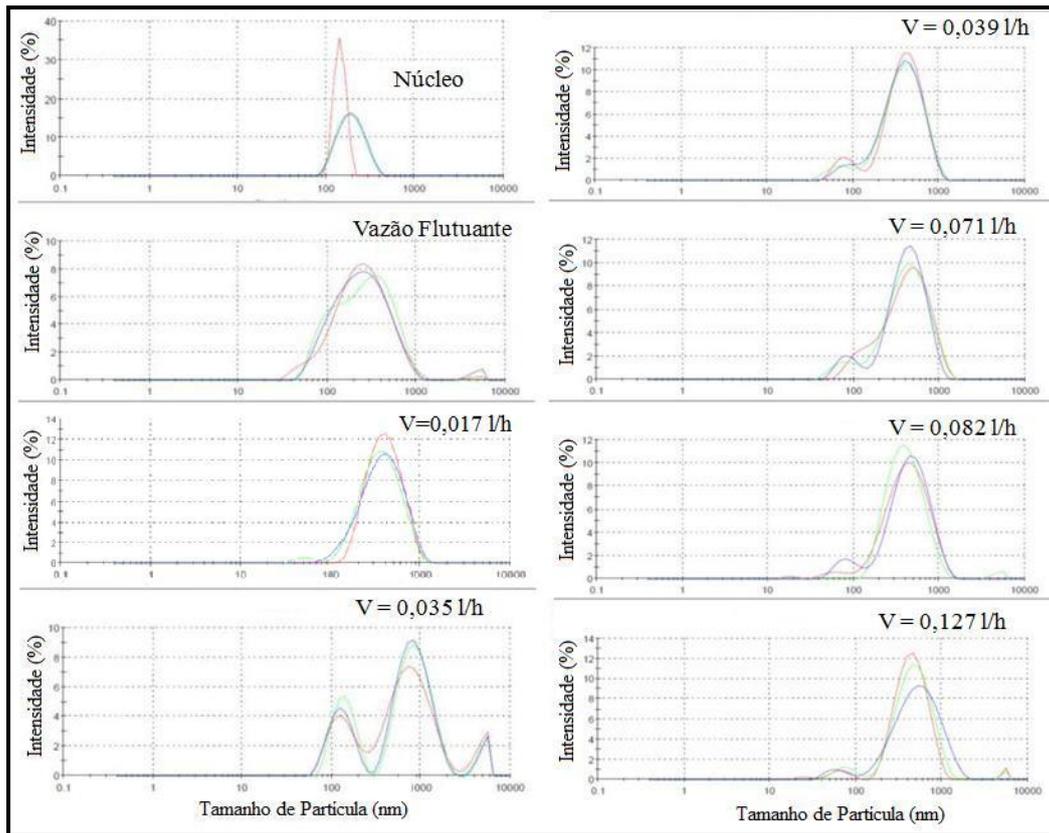


Figura 4.11. Efeito da vazão de alimentação de monômero na distribuição de tamanho das partículas emulsificadas.

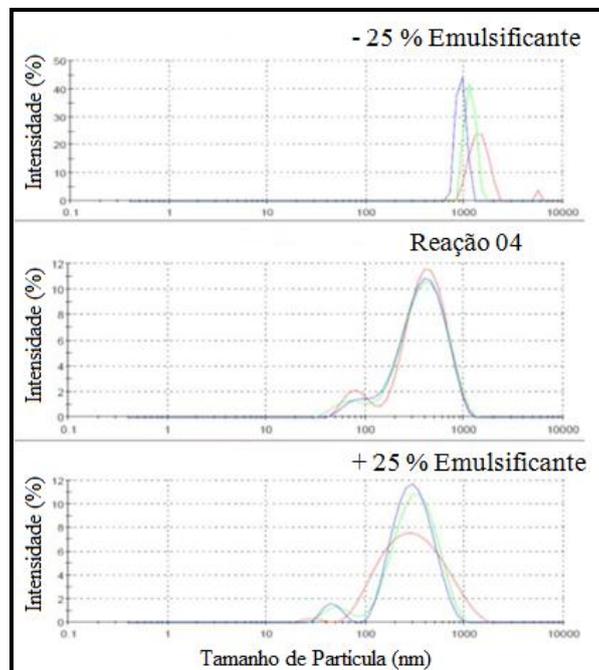


Figura 4.12. Efeito da quantidade de emulsificante na distribuição de tamanhos das partículas emulsificadas.

A influência provocada pela quantidade de iniciador na distribuição de tamanhos das partículas do látex também foi analisada e pode ser observada na Figura 4.13. Novamente apenas a reação 04, que apresenta condições operacionais semelhantes às outras duas, diferindo apenas em relação à quantidade de iniciador, foi utilizada para efeito comparativo. Nota-se, então, que o aumento na quantidade de iniciador aparentemente não provoca uma mudança significativa nas curvas de distribuição de tamanhos das partículas emulsificadas, de acordo com o modelo clássico usado para interpretar processos de polimerização em emulsão.

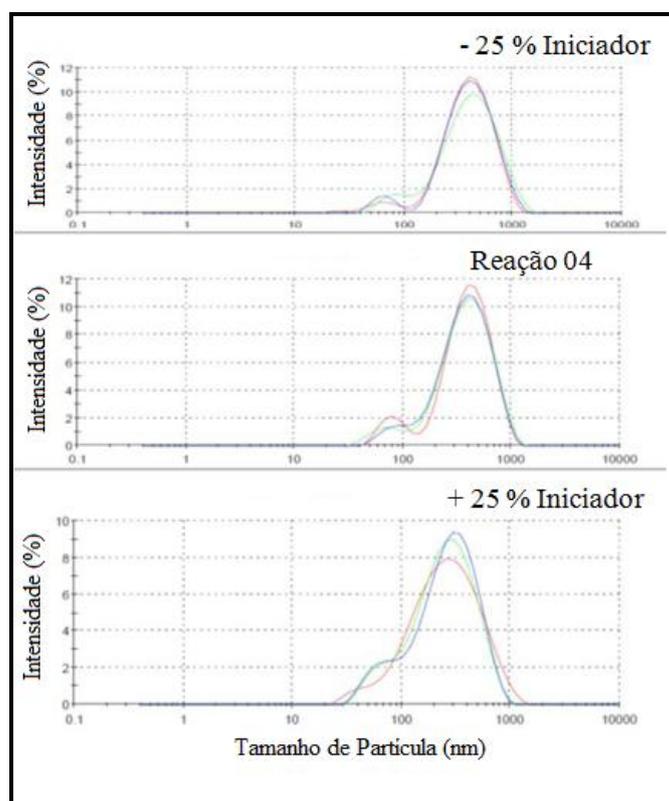


Figura 4.13. Efeito da quantidade de iniciador na distribuição de tamanhos das partículas emulsificadas.

Os valores dos diâmetros médios das partículas emulsificadas obtidos para cada uma das reações são apresentados na Tabela 4.5. Esses valores serão relacionados posteriormente com os valores de diâmetro médio de poro encontrados para os diferentes suportes produzidos.

Tabela 4.5. Valores dos diâmetros médios das partículas emulsificadas.

Reação	dp (nm)
1	198 ± 2
2	180 ± 2
3	381 ± 43
4	286 ± 6
5	301 ± 2
6	379 ± 5
7	325 ± 4
8	232 ± 4
9	1032 ± 314
10	302 ± 4
11	291 ± 8
12	304 ± 8

As partículas casca-núcleo também foram analisadas quanto às distribuições de tamanhos. A Figura 4.14 mostra o efeito da vazão de alimentação sobre a distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo. Ao contrário do látex, percebe-se que o aumento da vazão provoca um deslocamento continuado das curvas de distribuição para diâmetros maiores. Esse resultado é decorrente, muito provavelmente, das maiores taxas de aglomeração das partículas na presença de maiores quantidades de monômero livre e partículas em emulsão. A reação que foi conduzida com uma vazão de 0,127 l/h, não pôde ser analisada, uma vez que ocorreu a aglomeração completa das partículas, tendo que ser interrompida.

O efeito da quantidade de emulsificante também foi analisado e é mostrado na Figura 4.15. Foram apresentadas novamente, apenas para efeito comparativo, as distribuições das reações que apresentam vazões semelhantes, reação 03 ($V=0,035$ l/h) e reação 04 ($V=0,039$ l/h). Pode-se notar que o aumento na quantidade de emulsificante provoca um aumento de partículas com diâmetros menores. Esse aumento observado pode ser resultado da maior estabilização do sistema e redução das taxas de aglomeração.

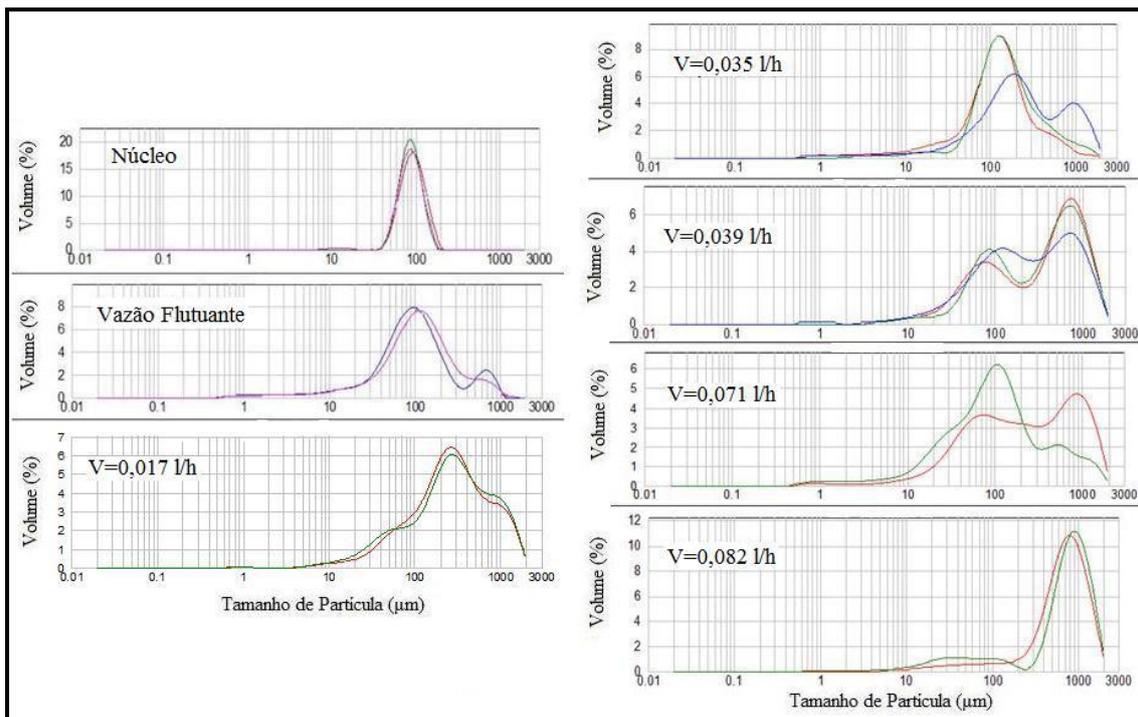


Figura 4.14. Efeito da vazão de alimentação na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo.

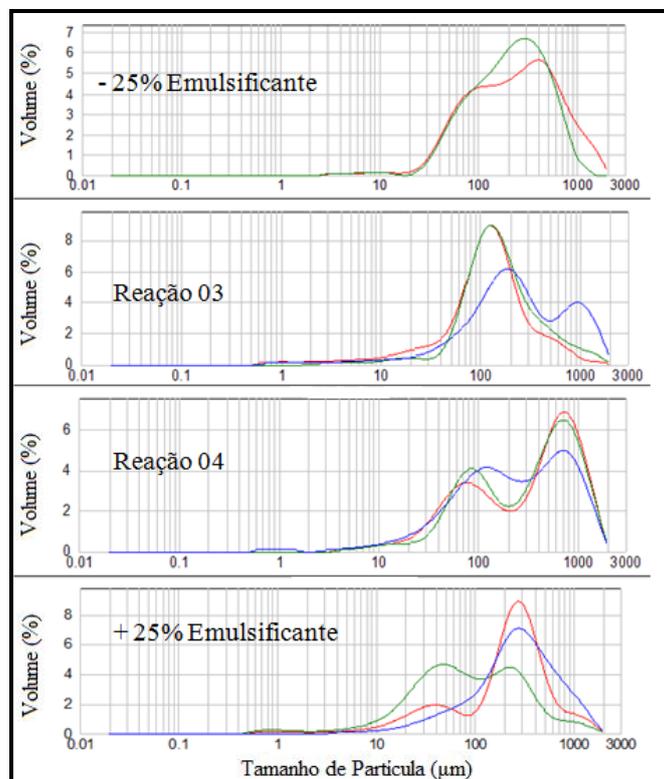


Figura 4.15. Efeito da quantidade de emulsificante na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo.

A influência da quantidade de iniciador no tamanho das partículas usadas como suporte também foi avaliada e é mostrada na Figura 4.16. Nota-se que o aumento na quantidade de iniciador também provoca um alargamento das curvas de distribuição e o aumento de partículas com diâmetros menores. Quanto mais iniciador, mais são geradas em emulsão, havendo uma maior aglomeração das mesmas. No entanto, há também um aumento de partículas com diâmetros maiores, muito provavelmente em função de uma maior aglomeração das mesmas. Novamente, para efeito comparativo, foram apresentadas as distribuições das reações que apresentam vazões semelhantes, reação 03 ($V=0,035$ l/h) e 04 ($V=0,039$ l/h).

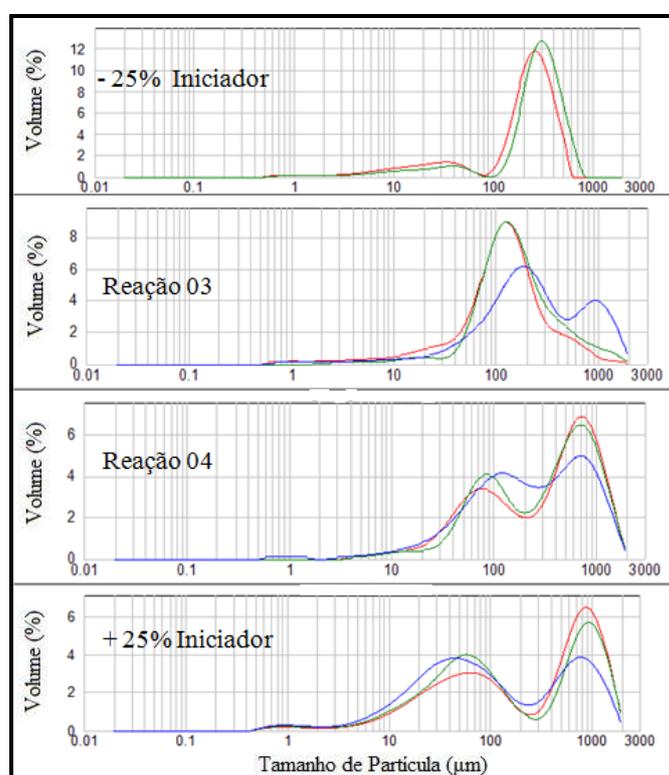


Figura 4.16. Efeito da quantidade de iniciador na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo.

4.1.1.3.2. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro e Volume Específico de Poros

A área específica dos suportes foi avaliada, assim como o diâmetro médio de poro e o volume específico de poros. Todos os valores encontrados são apresentados na

Tabela 4.6. Como mencionado no capítulo anterior, as análises foram feitas em laboratórios distintos, em função da dificuldade encontrada para realização de análises completas em um mesmo lugar. Nota-se na Tabela 4.6 que, a depender do laboratório onde a análise foi realizada, os valores obtidos diferem um pouco. No entanto, é importante salientar que o presente trabalho procura compreender o comportamento do sistema. Assim, apesar dos valores não serem exatamente os mesmos, o efeito de cada variável de entrada pôde ser analisado, já que comportamentos semelhantes são obtidos, independentemente do lugar onde as análises tenham sido realizadas. Observa-se também que a reação em que a vazão flutuou resultou em um suporte com maior área. Dessa forma, esta maneira de operar o sistema deverá ser melhor investigada posteriormente.

Tabela 4.6. Resultados de área específica, volume específico de poros e diâmetro médio de poro para cada um dos suportes produzidos.

Reação	Legenda	Sesp UFSCar (m ² /g)	Sesp UERJ (m ² /g)	Sesp UFRJ (m ² /g)	Vesp (cm ³ /g) UFRJ	Vesp (cm ³ /g) UERJ	Dp (Å) UFRJ	Dp (Å) UERJ
1	Vazão Flutuante	35,1	-	27,3	0,20	-	287,6	-
2	Núcleo	0,2	-	-	-	-	-	-
3	V=0,035 l/h	16,5	10,6	7,8	0,06	0,07	300,9	274,7
4	V=0,039 l/h	2,2	-	-	-	-	-	-
5	V=0,071 l/h	5,7	-	-	-	-	-	-
6	V=0,127 l/h	-	-	-	-	-	-	-
7	V=0,082 l/h	2,6	1,4	-	-	0,01	-	416,4
8	+ 25% Emulsificante	4,7	2,9	-	-	0,03	-	400,8
9	- 25% Emulsificante	8,3	6,5	-	-	0,05	-	341,4
10	- 25% Iniciador	2,0	2,3	-	-	0,03	-	477,0
11	+ 25% Iniciador	12,5	6,5	11,2	0,08	0,08	299,7	401,0
12	V=0,017 l/h	-	3,3	-	-	0,02	-	327,6

O suporte comercial Accurel® MP1000 também foi empregado no trabalho com o objetivo de servir como uma referência para análise de desempenho dos suportes desenvolvidos. Esse material apresenta área específica igual a 39 m²/g, diâmetro médio

de poro igual a 229,91 Å e volume específico de poros igual a 0,236 cm³/g (BESTETI, 2011). De acordo com BESTETI (2009), o valor de área específica obtido para partículas com casca-núcleo de poliestireno era de 7,9 m²/g. No entanto, a duração da etapa de suspensão foi de 4h, o que reduz a eficiência no recobrimento por causa da maior rigidez do núcleo. No presente estudo, como o objetivo principal é a geração de suportes enzimáticos, optou-se por empregar um tempo de suspensão de 2h, resultando em núcleos mais bem recobertos e, portanto, áreas específicas mais expressivas (LENZI, 2002).

O efeito de cada uma das variáveis operacionais sobre a área específica dos suportes poliméricos é mostrado na Figura 4.17. Com base nas análises realizadas na UFSCar, pode-se observar que vazões acima de 0,035 l/h provocam uma queda na área específica dos suportes, excetuando-se a reação 04, que apresentou valor menor do que o esperado, diante dos demais resultados obtidos. O comportamento observado com base nos dados da UFSCar é também percebido para as análises realizadas na UERJ. O aumento da vazão possivelmente provoca uma maior aglomeração das partículas, resultando em uma redução da área específica dos suportes. Contudo, pode-se perceber também que a diminuição pronunciada da vazão também provoca uma queda na área específica dos suportes, provavelmente por causa da redução de partículas geradas em emulsão, havendo uma diminuição no recobrimento. Assim, parece existir uma vazão ótima para a obtenção de suportes com máxima área específica, que no caso analisado deve ser próxima à vazão de 0,035 l/h.

Com o propósito de analisar a influência da massa de emulsificante com base nas análises realizadas na UFSCar, foram mostradas, apenas para efeito comparativo, as áreas dos suportes produzidos a partir das reações (03 e 04), cujas vazões são próximas. Essas reações foram conduzidas sob condições semelhantes às outras duas apresentadas, diferindo apenas em relação à massa de emulsificante empregada. Novamente, observa-se que os suportes obtidos da reação 04 apresentam área específica muito baixa, se comparada às demais, valor este inferior inclusive ao encontrado por BESTETI (2011), cuja etapa de suspensão foi mantida por 4h. Dessa forma, a reação 04 foi desconsiderada na presente análise. Assim, observa-se que tanto o aumento quanto a diminuição da quantidade de emulsificante provocam uma queda na área específica dos suportes produzidos. O mesmo comportamento é observado nas análises realizadas na

UERJ. Nota-se também que o valor encontrado para a análise realizada na UFRJ foi similar ao obtido para o mesmo suporte na UERJ.

A ocorrência de um valor máximo de área quando uma concentração intermediária de emulsificante é empregada é resultado da provável diminuição da estabilidade das partículas em emulsão, com a diminuição da quantidade de emulsificante. Dessa forma, ocorre uma maior aglomeração das partículas, resultando em suportes com menores áreas. Já aumento na quantidade de emulsificante, possivelmente estabiliza de forma mais intensa as micelas formadas, resultando em um maior número de partículas menores e menor eficiência de recobrimento. Essas partículas menores mais estabilizadas recobrem menos o núcleo, resultando em suportes com menores áreas.

O efeito da massa de iniciador sobre a área específica das partículas poliméricas também é observado na Figura 4.17. Com base nas análises realizadas na UFSCar, são apresentadas, para efeito comparativo, as áreas dos suportes produzidos a partir das reações 03 e 04. Contudo, como foi discutido acima, a reação 04 apresenta comportamento muito distinto das demais, sendo, então, considerada um *outlier* para a análise em questão. Assim, um máximo valor de área específica é observado quando uma quantidade intermediária de iniciador é empregada na reação. O mesmo comportamento é observado a partir das análises realizadas na UERJ. Apenas as análises feitas na UFRJ apresentam um decréscimo na área dos suportes quando a concentração intermediária de iniciador é utilizada. No entanto, os valores mostrados são muito próximos entre si, podendo essa diminuição estar associada a um erro de medição.

Provavelmente, quanto menor é a concentração de iniciador no meio, menor é o número de partículas formadas e menor é a taxa de polimerização, resultando em menor grau de recobrimento e área específica dos suportes. Contudo, com o aumento da massa de iniciador, possivelmente mais partículas em emulsão são formadas, resultando em uma maior aglomeração das partículas casca-núcleo. Assim, suportes com menores áreas são gerados. Os resultados obtidos mostram que as condições definidas por LENZI (2002), BESTETI (2009) e BESTETI (2011) estão próximas das condições que resultam em máxima área específica dos suportes de poliestireno.

É possível observar na Figura 4.18 que existe uma relação linear muito forte entre a área específica e o volume específico de poros dos suportes produzidos. Observa-se, então, que ambas as variáveis aparentam ser linearmente dependentes.

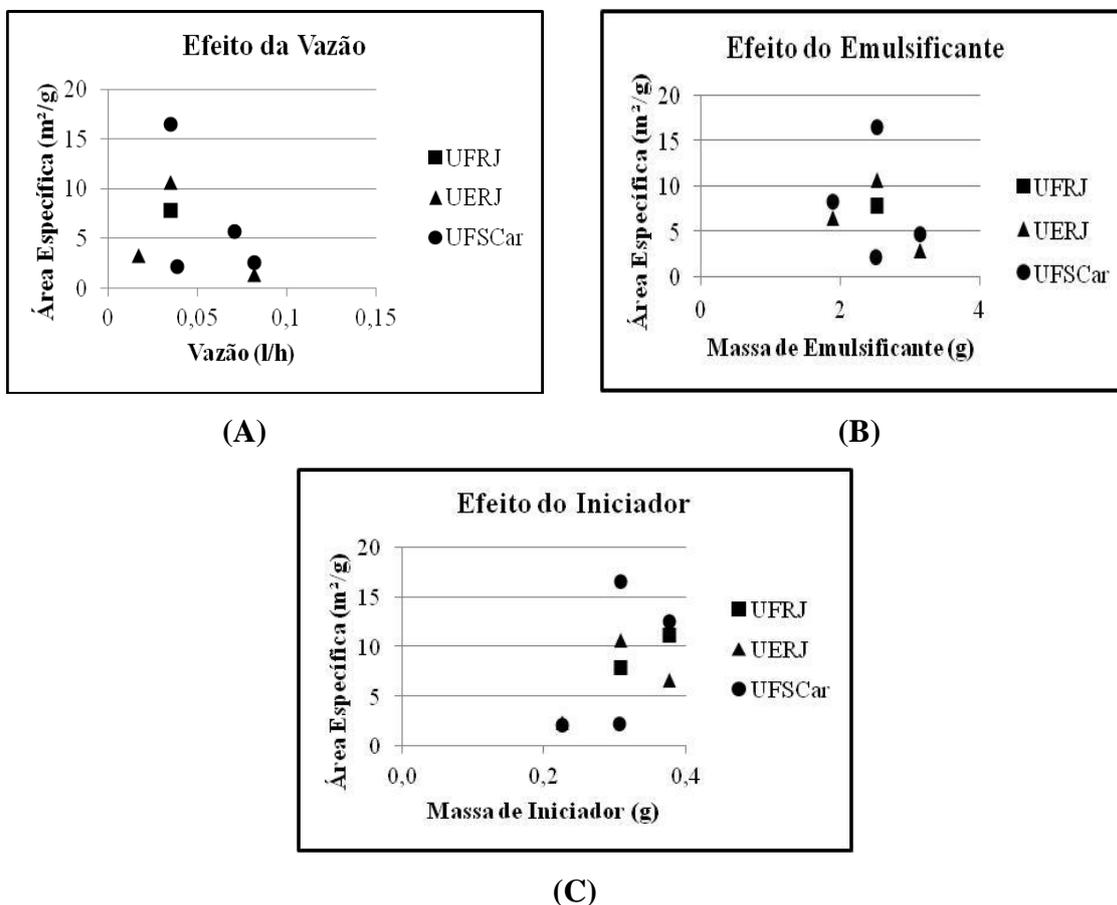


Figura 4.17. Efeito de cada uma das variáveis operacionais sobre a área específica dos suportes produzidos: **(A)** vazão de alimentação de monômero; **(B)** quantidade de emulsificante; **(C)** quantidade de iniciador.

Com o objetivo de melhor entender a relação linear existente entre essas variáveis, é mostrada a Figura 4.19. De acordo com LENZI (2002), os espaços existentes entre as partículas emulsificadas e depositadas sobre o núcleo são responsáveis pela geração dos poros e da área específica na casca do suporte. De acordo com o modelo geométrico proposto, é possível escrever a Equação 4.1, que descreve a porosidade da casca das partículas casca-núcleo, não havendo uma relação entre a porosidade e o raio das partículas emulsificadas. Dessa forma, caso a morfologia das partículas depositadas na casca fosse determinante para o aumento da área dos suportes,

a área específica aumentaria e o volume específico de poros manter-se-ia constante, para uma dada quantidade de polímero na casca. Assim, a Figura 4.20 seria obtida em lugar da Figura 4.18.

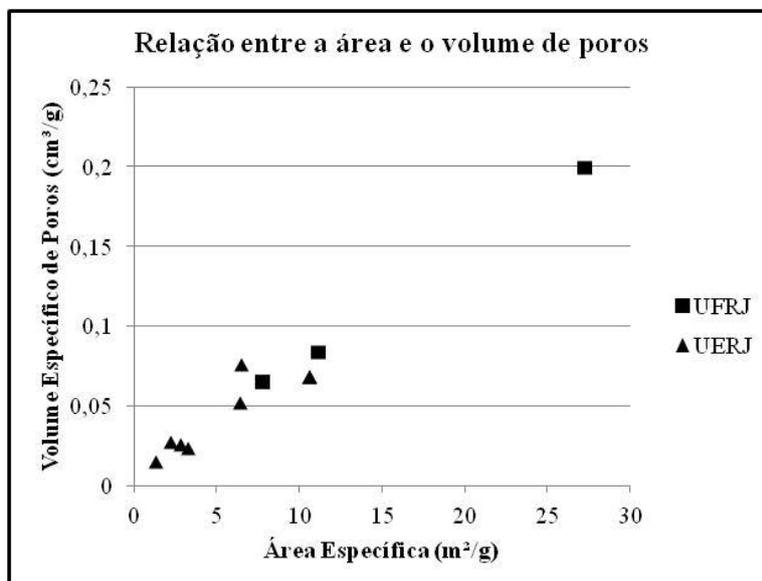


Figura 4.18. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e o volume específico de poros.

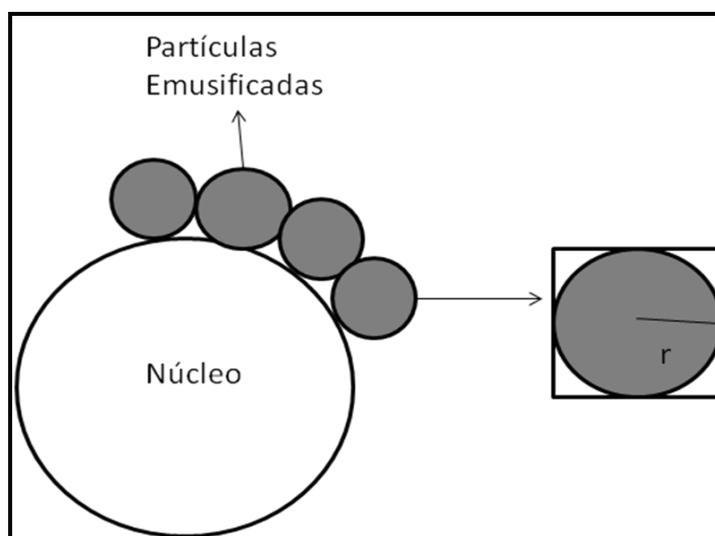


Figura 4.19. Esquema da geração de partículas casca-núcleo.

$$\varepsilon = \frac{V_q - V_e}{V_q} = \frac{6 - \pi}{6}$$

Equação 4.1. Cálculo da porosidade das partículas com morfologia casca-núcleo.

sendo: ε , a porosidade das partículas casca-núcleo; V_q , o volume do cubo apresentado na Figura 4.19, cujo lado é igual a $2 \cdot r$; V_e , o volume da esfera apresentada na Figura 4.19, cujo raio é igual a r .

O comportamento observado na Figura 4.18 é, portanto um indício de que a área específica dos suportes poliméricos é resultado principalmente da quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo e não à morfologia das partículas emulsificadas.

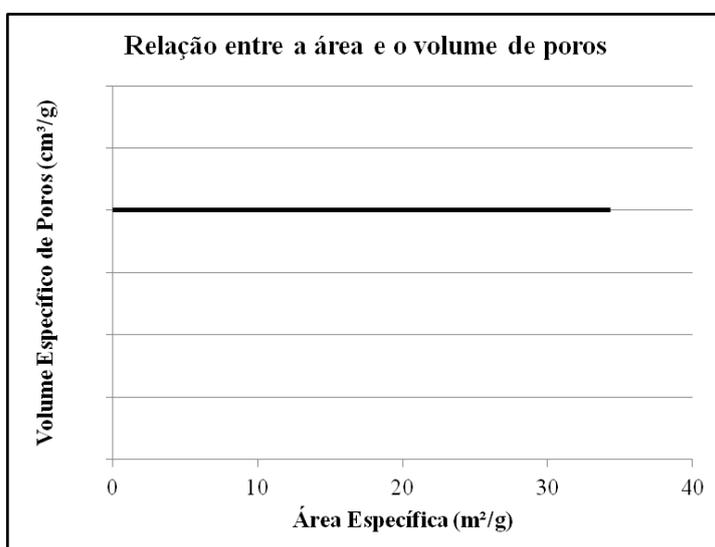


Figura 4.20. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e o volume específico de poros, avaliando apenas o efeito da morfologia das partículas emulsificadas.

A relação existente entre a área específica dos suportes produzidos e o diâmetro médio de poro é mostrada na Figura 4.21. Percebe-se que o aumento da área específica é acompanhado pela leve diminuição do diâmetro médio de poro. Esse resultado corrobora a interpretação proposta anteriormente.

Ao considerar apenas o efeito da morfologia das partículas emulsificadas sobre a área específica dos suportes, é possível encontrar a relação apresentada na Equação 4.2. Assim, o aumento da área específica seria acompanhado pela queda pronunciada do

diâmetro médio de poro, como mostrado na Figura 4.22. Contudo, o comportamento observado, mostrado na Figura 4.21, é distinto. O aumento da área é acompanhado pela queda suave do diâmetro médio de poro, que aparentemente tende a um valor constante.

Assim, é possível perceber mais um indício de que a área está relacionada principalmente à eficiência de recobrimento do núcleo. No entanto, o declínio do diâmetro observado quando baixos valores de área são considerados mostra que a morfologia das partículas emulsificadas também exerce certa influência sobre a área específica dos suportes, embora com menor importância.

$$A_e \propto \frac{\pi}{r}$$

Equação 4.2. Cálculo da área específica das partículas casca-núcleo, avaliando o efeito do raio médio de poro.

sendo: A_e , a área específica das partículas casca-núcleo; r , o raio da esfera apresentada na Figura 4.19, diretamente relacionado ao raio médio de poro ou ao diâmetro médio de poro.

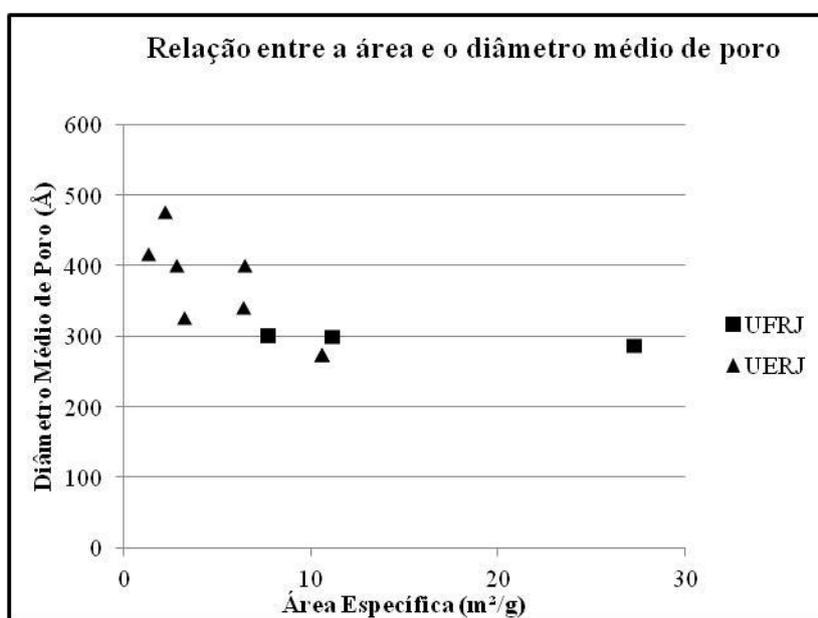


Figura 4.21. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e o diâmetro médio de poro.

A influência das variáveis operacionais no volume específico de poros é mostrada na Figura 4.23. Observa-se um valor máximo para o volume específico quando uma vazão intermediária é utilizada. Ao analisar a influência da massa de emulsificante, nota-se um volume específico máximo quando uma quantidade intermediária de emulsificante foi empregada na reação. Esses resultados, como já era esperado, são semelhantes aos observados para área específica, uma vez que ambas as variáveis aparentam ser linearmente dependentes. Já o aumento na quantidade de iniciador provoca o aumento no volume específico de poros, diferindo em relação ao que seria esperado: um valor máximo no ponto central. Contudo, a diferença entre os dois últimos pontos é pequena, podendo estar relacionada ao erro experimental envolvido na análise. Novamente o valor obtido a partir da análise realizada na UFRJ é similar ao realizado na UERJ.

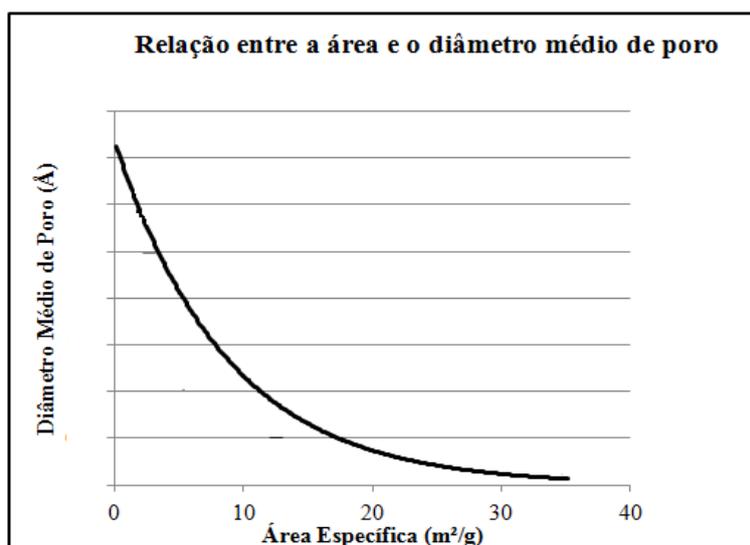


Figura 4.22. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e o diâmetro médio de poro, avaliando apenas o efeito da morfologia das partículas emulsificadas.

Por fim, a influência das variáveis operacionais sobre o diâmetro médio de poros é apresentada na Figura 4.24. Aparentemente, o aumento da vazão provoca um aumento no diâmetro médio de poros, possivelmente em função de uma maior aglomeração das partículas.

Ao observar o efeito da massa de emulsificante, nota-se que tanto a diminuição quanto o aumento da massa de emulsificante a partir do valor central, resultam em

maiores diâmetros de poro. Possivelmente, essas alterações na massa de emulsificante provocam um aumento na taxa de aglomeração das partículas, o que também foi observado para a análise de área específica, resultando em maiores diâmetros de poro.

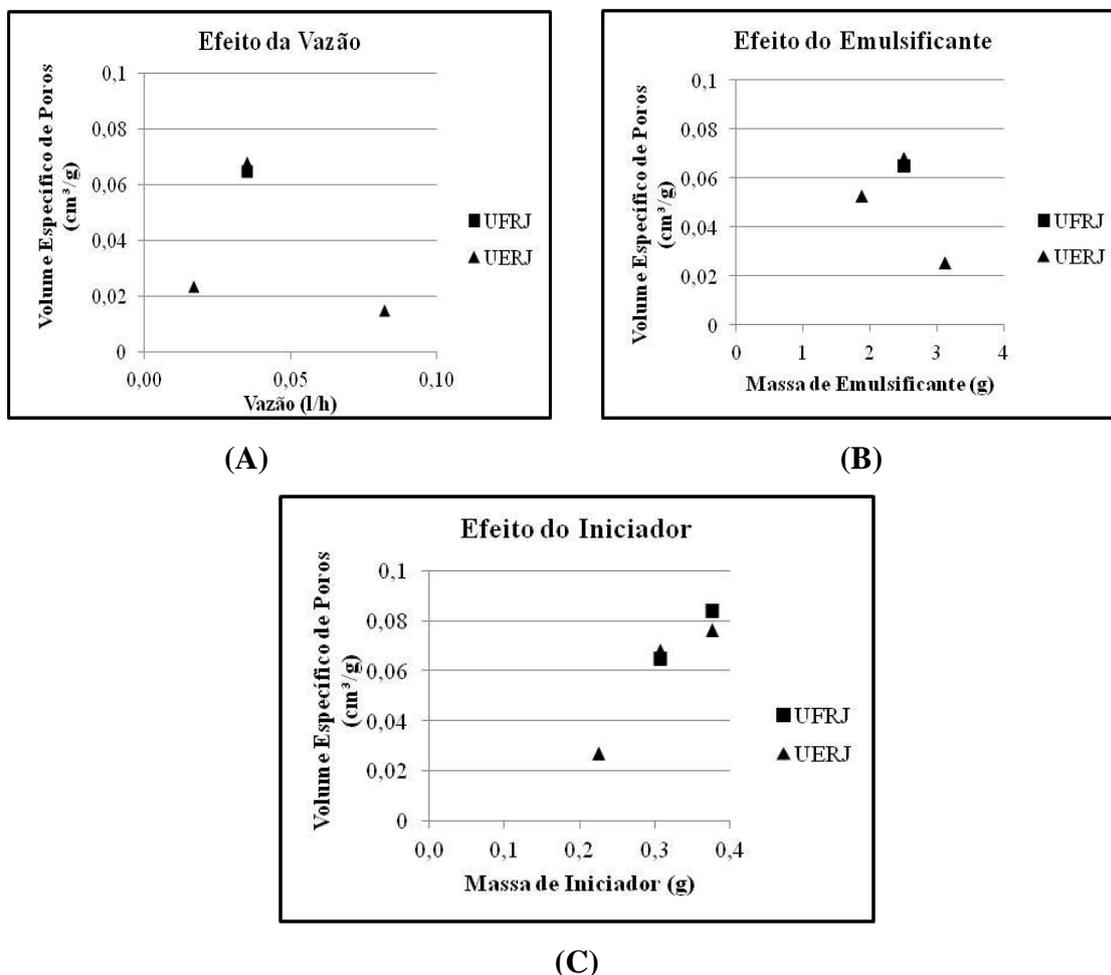


Figura 4.23. Efeito de cada uma das variáveis operacionais no volume específico de poros dos suportes produzidos: **(A)** vazão de alimentação de monômero; **(B)** quantidade de emulsificante; **(C)** quantidade de iniciador.

Aparentemente a massa de iniciador afeta pouco o diâmetro médio de poro das partículas produzidas, a partir da análise realizada na UFRJ. No entanto, com base nas análises realizadas na UERJ, observa-se a existência de um mínimo no valor do diâmetro de poro, quando uma quantidade intermediária de iniciador é empregada. Este comportamento pode estar novamente associado à maior aglomeração das partículas, que resultaria em diâmetros maiores.

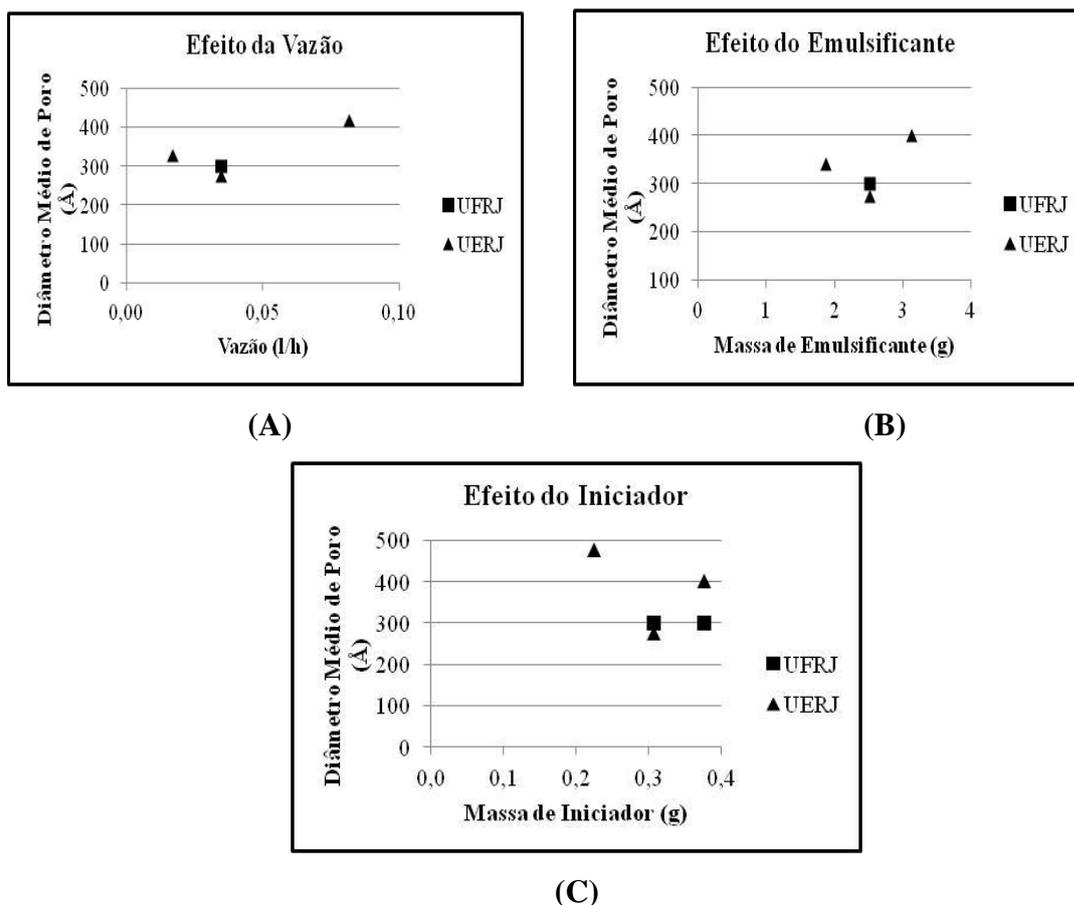


Figura 4.24. Efeito de cada uma das variáveis operacionais no diâmetro médio de poro dos suportes produzidos: **(A)** vazão de alimentação de monômero; **(B)** quantidade de emulsificante; **(C)** quantidade de iniciador.

4.1.2. Avaliação dos Parâmetros de Imobilização

Foram realizadas imobilizações enzimáticas em todos os suportes produzidos neste primeiro bloco de reações. Duas imobilizações também foram feitas utilizando o suporte comercial, Accurel® MP1000: uma imobilização com a concentração proteica de referência, utilizada ao longo de todo o trabalho, e outra em que foi empregada maior carga proteica, de forma a verificar a maneira como os parâmetros de imobilização são alterados por essa variável.

São apresentadas nas Figuras 4.25 e 4.26 as cinéticas de imobilização encontradas para cada uma das imobilizações realizadas, baseadas nos valores de atividade hidrolítica. Pode-se perceber que a maior parte dos suportes adsorve mais de 85% da atividade enzimática inicial. Nota-se também que os suportes que adsorvem

menos enzima são os que apresentam as menores áreas específicas. O núcleo, apesar de apresentar área específica próxima de zero, também adsorve uma parte da carga enzimática, em função das forças de interação existentes entre a lipase e os suportes hidrofóbicos. Observa-se também que, apesar do aumento provocado na carga proteica inicial (mencionado no texto como maior carga Ptn), o suporte comercial continua a imobilizar mais de 90% da carga enzimática; ou seja, a imobilização ainda sim foi conduzida abaixo do nível de saturação do suporte. O efeito detalhado de cada uma das variáveis operacionais nos parâmetros de imobilização é mostrado adiante. Vale destacar que a enzima CAL-B apresenta elevada estabilidade a 25°C (BRÍGIDA, 2010). Como as imobilizações realizadas no presente trabalho ocorreram a baixas temperaturas, pode-se garantir que a diminuição de atividade observada ao longo do tempo está associada a uma maior adsorção de proteína ao suporte e não à desnaturação da mesma.

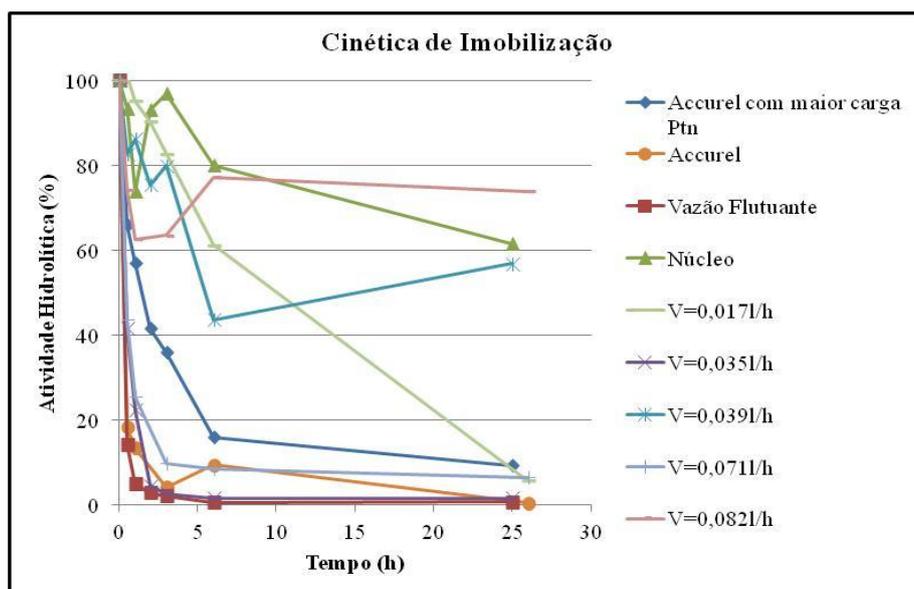


Figura 4.25. Análise cinética das imobilizações realizadas, avaliando o efeito da vazão.

É possível observar também a evolução da quantidade de proteína presente no sobrenadante ao longo das imobilizações. Esses resultados são mostrados na Figura 4.27. Nota-se que a maior parte dos suportes adsorve mais de 70% da quantidade de proteína inicial. Esse resultado corrobora a ideia de que a diminuição observada na atividade hidrolítica é provocada pela maior adsorção de proteína ao longo da imobilização e não por uma possível desnaturação da enzima.

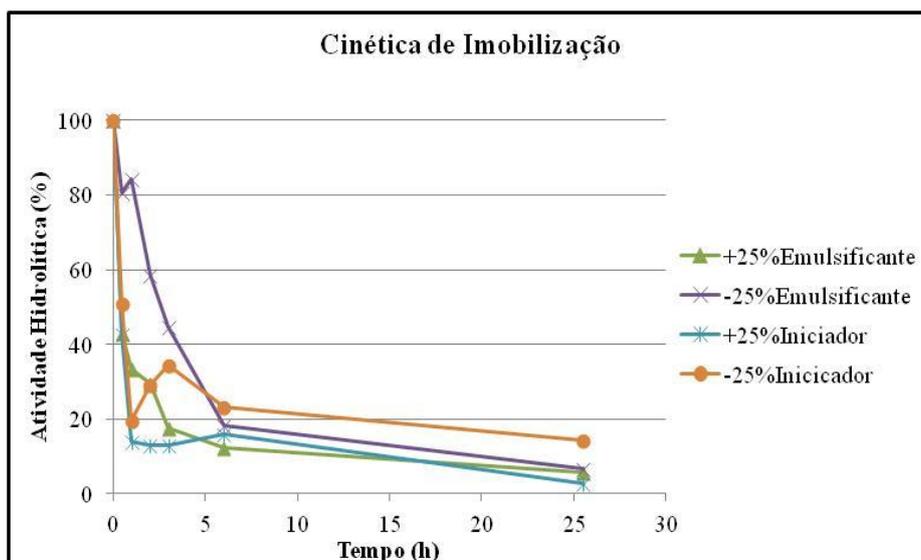


Figura 4.26. Análise cinética das imobilizações realizadas, avaliando o efeito da quantidade de emulsificante e de iniciador.

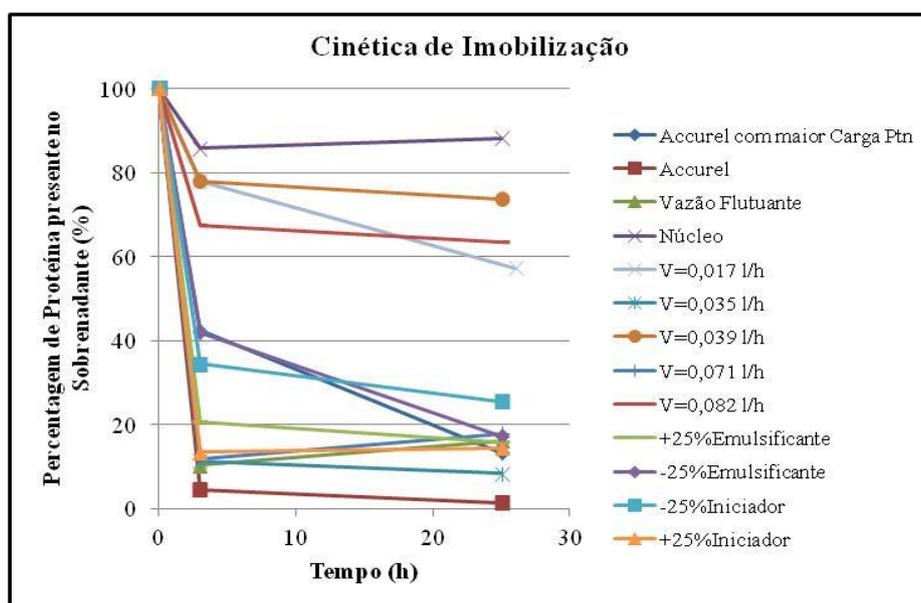


Figura 4.27. Análise cinética das imobilizações realizadas baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante.

O desempenho dos diferentes biocatalisadores produzidos também foi avaliado. Na Figura 4.28 são apresentadas as atividades de hidrólise das enzimas imobilizadas. Nota-se que os valores absolutos encontrados são baixos. Esse resultado era esperado, uma vez que a CAL-B é uma enzima empregada principalmente para catalisar reações de esterificação. Contudo, os valores das atividades de hidrólise dos biocatalisadores

são fundamentais para a determinação do parâmetro retenção de atividade, uma vez que a determinação da atividade de esterificação da enzima solúvel é muito difícil de ser determinada. Vale ressaltar que os erros experimentais observados são elevados, embora sejam intrínsecos a esse tipo de análise. Assim, em um estudo posterior a metodologia empregada deverá ser avaliada de forma a minimizar os erros experimentais. Apesar disso, é possível avaliar com confiança as tendências observadas.

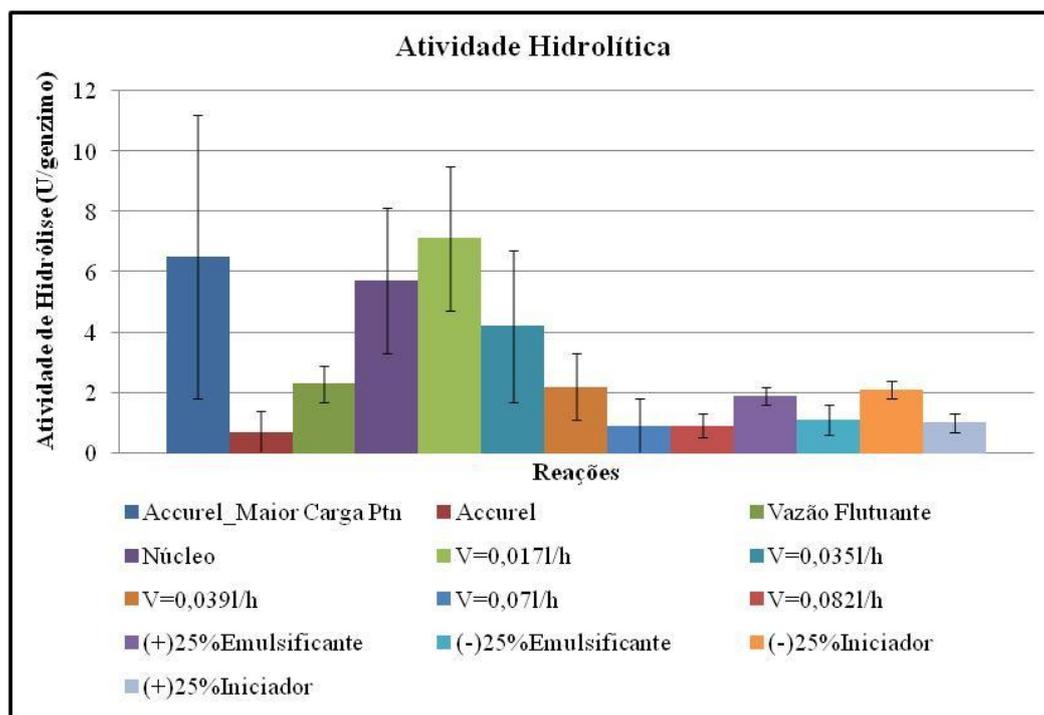


Figura 4.28. Atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas considerando o primeiro bloco de reações.

Na Figura 4.28 é possível observar, a partir da comparação das atividades das enzimas imobilizadas no suporte comercial, que o aumento na carga proteica inicial provoca um aumento da atividade hidrolítica da enzima imobilizada, pois uma maior quantidade de enzima foi adsorvida ao suporte. Nota-se também que o núcleo apresenta uma das maiores atividades hidrolíticas obtidas. Esse comportamento pode ser explicado pela maior exposição das enzimas aos substratos, uma vez que todas as enzimas adsorvidas estão localizadas na superfície externa da partícula, sendo minimizados de forma substancial os efeitos difusivos. Esse resultado corrobora a ideia de que os fenômenos de resistência à transferência de massa estão presentes de forma mais expressiva nos suportes porosos produzidos, como mostrado adiante.

O aumento da vazão provoca uma diminuição da atividade de hidrólise. O aumento na quantidade de emulsificante provoca um aumento na atividade hidrolítica, enquanto o aumento na quantidade de iniciador provoca uma queda na atividade de hidrólise. Esses efeitos observados serão melhor avaliados conjuntamente com as propriedades morfológicas dos suportes produzidos e dos parâmetros de imobilização obtidos. É importante destacar que estudos foram realizados empregando-se apenas os suportes (sem enzima) nas reações de hidrólise, não sendo observada nenhuma atividade desses materiais (BESTETI, 2011). Dessa forma, pode-se garantir que as atividades observadas provêm das enzimas imobilizadas.

As atividades de esterificação das enzimas imobilizadas nos diferentes suportes são apresentadas na Figura 4.29. Os valores absolutos são mais expressivos, como mencionado anteriormente. Nota-se que, a partir da comparação das imobilizações realizadas no suporte comercial, o aumento na carga proteica inicial provoca um aumento da atividade de esterificação da enzima imobilizada. Este comportamento é similar ao observado para a atividade de hidrólise, uma vez que uma maior quantidade de enzima ficou adsorvida no suporte. O núcleo, nesta análise, apresenta uma das menores atividades de esterificação. Esse comportamento é antagônico ao observado para a atividade de hidrólise. Os efeitos difusionais são mais intensos nas atividades hidrolíticas muito provavelmente em função da rapidez da reação (não há tempo suficiente para os produtos gerados atingirem o seio do meio reacional) e da taxa elevada da mesma (assim uma quantidade expressiva de produto é gerada, permanecendo na superfície do biocatalisador). No entanto, as reações de esterificação são menos intensas e mais longas.

O aumento da vazão provoca uma diminuição da atividade de esterificação. O aumento na quantidade de emulsificante provoca um aumento na atividade de esterificação, enquanto a variação na quantidade de iniciador praticamente não altera a atividade da enzima imobilizada. Somente para efeito comparativo, a atividade de esterificação encontrada para o biocatalisador comercial Novozym® 435 foi de (2728 ± 400) UI/g_{enzimo} (CUNHA, 2011).

Na Tabela 4.7 são apresentados os diferentes parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações realizadas. Esses parâmetros serão fundamentais para o entendimento do efeito da morfologia dos suportes no desempenho dos biocatalisadores produzidos.

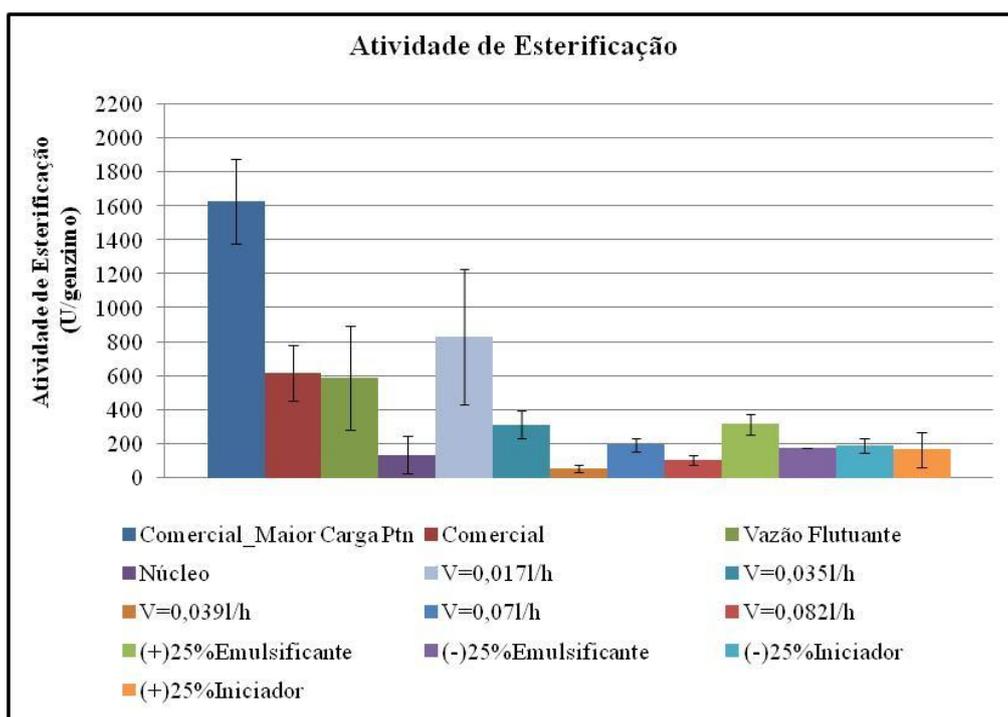


Figura 4.29. Atividade de esterificação das enzimas imobilizadas considerando apenas primeiro bloco de reações.

Para compreender melhor a influência das características morfológicas dos suportes poliméricos no processo de imobilização e no desempenho dos biocatalisadores produzidos, serão apresentados diferentes gráficos que correlacionam as variáveis estudadas.

A Figura 4.30 mostra a relação existente entre a área específica dos suportes produzidos e os respectivos parâmetros de imobilização. É possível perceber que há uma área mínima, relativamente baixa, necessária para que praticamente toda a carga proteica seja adsorvida. Observa-se também que o aumento da área provoca uma redução na retenção de atividade; ou seja, quanto maior é a área, menos ativa é a enzima que ficou adsorvida no suporte. Provavelmente, com o aumento da área, mais pronunciados são os efeitos difusionais observados, provocando, assim, uma queda na atividade da enzima adsorvida.

Tabela 4.7. Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações.

Suportes	Legenda	Uc (U/gsuporte)	Uimo Hidrolítica (U/genzimo)	Uimo Esterificação (U/genzimo)	Uteorico (U/gsuporte)	Rendimento de Imobilização (%)	Retenção de Atividade Hidrólise (%)	Conc. de Ptn retida no suporte (mg/gsuporte)
Acc_1	Comercial_Maior Carga Ptn	316,4	6,5±4,7	1.626±249	287,1	90,7	2,3	13,5
Acc_2	Comercial	91,8	0,7±0,7	616±166	91,4	99,5	0,7	4,5
Reação_01	Vazão Flutuante	127,0	2,3±0,6	588±307	126,0	99,2	1,8	5,2
Reação_02	Núcleo	84,4	5,7±2,4	133±111	32,4	38,4	17,6	0,5
Reação_03	V=0,035l/h	116,8	4,2±2,5	311±80	115,0	98,4	3,6	5,3
Reação_04	V=0,039l/h	80,7	2,2±1,1	56±21	34,8	43,1	6,3	1,0
Reação_05	V=0,07l/h	91,6	0,9±0,9	193±40	85,6	93,5	1,1	3,7
Reação_06	V=0,127/h	-	-	-	-	-	-	-
Reação_07	V=0,082l/h	84,2	0,9±0,4	104±26	21,9	26,0	3,9	1,5
Reação_12	V=0,017l/h	73,5	7,1±2,4	828±397	69,3	94,2	10,3	1,5
Reação_08	(+)25%Emulsificante	82,1	1,9±0,3	315±59	77,3	94,2	2,4	4,3
Reação_09	(-)25%Emulsificante	82,1	1,1±0,5	175±3	76,5	93,2	1,5	4,3
Reação_10	(-)25%Iniciador	83,5	2,1±0,3	186±43	71,7	85,9	2,9	3,9
Reação_11	(+)25%Iniciador	83,0	1,0±0,3	165±104	80,8	97,4	1,2	4,5

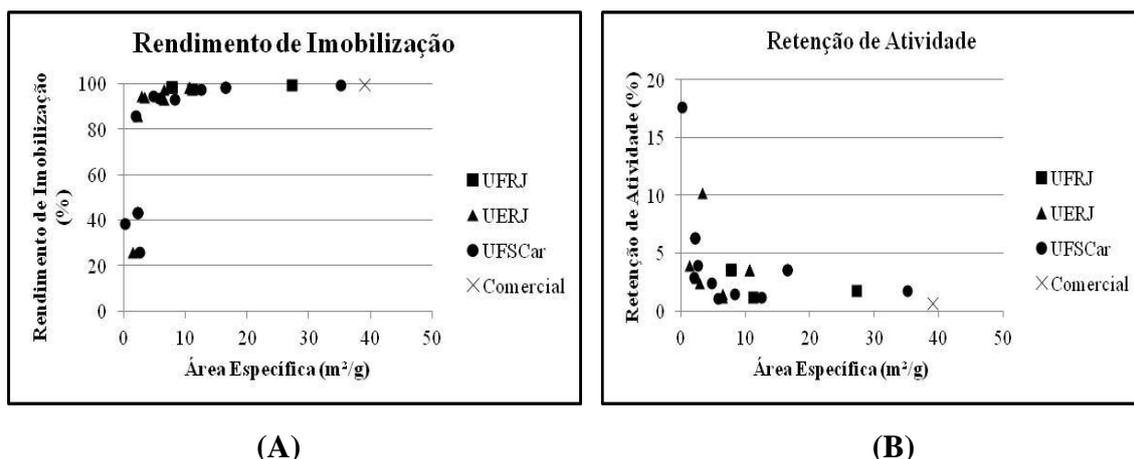


Figura 4.30. Efeito da área específica dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: **(A)** rendimento de imobilização, **(B)** retenção de atividade.

O efeito da área específica sobre a atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas é mostrado na Figura 4.31. Aparentemente não há uma relação direta entre essas variáveis, embora seja possível observar uma tendência de queda de atividade hidrolítica com o aumento da área específica. Muito provavelmente isso ocorre em função das resistências à transferência de massa, mencionadas anteriormente. Os erros experimentais obtidos foram mostrados apenas para os suportes caracterizados na UFSCar e para o suporte comercial, com o objetivo de facilitar a análise do gráfico. Contudo, como foi mostrado na Tabela 4.7, os erros foram caracterizados para cada uma das séries apresentadas.

A influência do volume específico de poros sobre os parâmetros de imobilização é apresentada na Figura 4.32. Observa-se novamente que há um volume mínimo para que todo o conteúdo proteico seja adsorvido. Nota-se também que a retenção de atividade novamente cai com o volume. Esses comportamentos já podiam ser esperados, uma vez que a área específica e o volume específico de poros aparentam ser linearmente dependentes, como mostrado anteriormente.

da UFRJ não foram apresentados para não dificultar o entendimento do gráfico apresentado, mas são apresentados na Tabela 4.7.

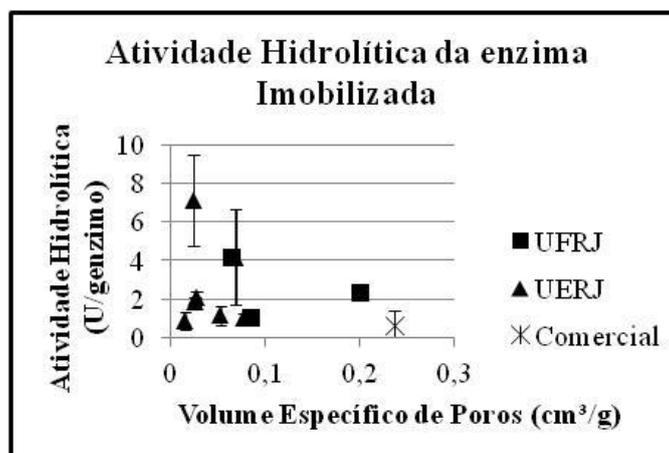


Figura 4.33. Efeito do volume específico de poros dos suportes na atividade de hidrólise da enzima imobilizada.

A influência do diâmetro médio de poro sobre os parâmetros de imobilização é apresentada na Figura 4.34. Aparentemente, o diâmetro de poro não interfere no rendimento de imobilização. Segundo MOJOVIC *et al.* (1998), as lipases podem ser consideradas esferas com diâmetros que variam na faixa de (50-70) Å. Dessa forma, o resultado obtido é pertinente, uma vez que os diâmetros médios de poro apresentados pelos diferentes suportes são bastante superiores ao tamanho médio da enzima. Apenas a reação 07 apresenta um comportamento diferenciado, o que pode estar associado à baixa área apresentada pelo suporte, variável que não está sendo considerada na análise em questão. Pode-se observar também que não há uma relação direta entre o diâmetro médio de poro e a retenção de atividade, muito provavelmente em decorrência do tamanho elevado dos poros, não influenciando, assim, na atividade da enzima que ficou adsorvida ao suporte.

Na Figura 4.35 é mostrado o efeito do diâmetro médio de poros sobre a atividade de hidrólise da enzima imobilizada. Aparentemente o diâmetro médio de poro não afeta a atividade hidrolítica do biocatalisador pelas razões já apresentadas.

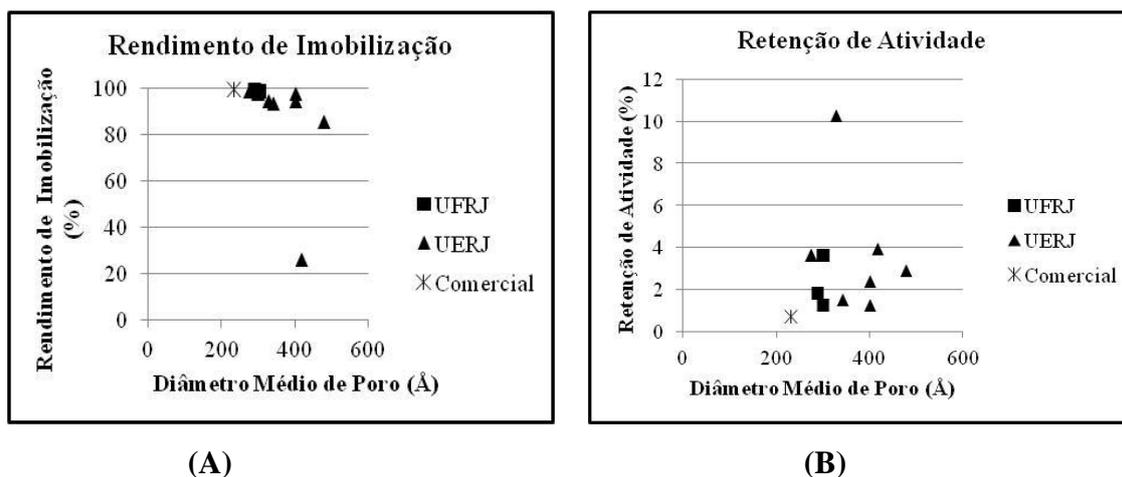


Figura 4.34. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: **(A)** rendimento de imobilização, **(B)** retenção de atividade.

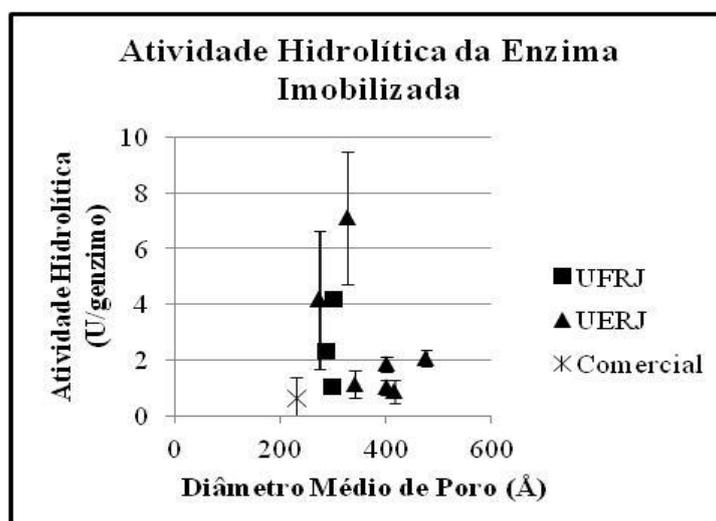


Figura 4.35. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes na atividade de hidrólise da enzima imobilizada.

A seguir serão apresentadas as relações existentes entre as propriedades morfológicas dos suportes sintetizados e as atividades de esterificação dos biocatalisadores produzidos. É possível avaliar, a partir da Figura 4.36, o efeito da área específica sobre a atividade de esterificação. Observa-se que o aumento da área específica é acompanhado pelo aumento da atividade de esterificação, muito provavelmente em função da maior quantidade de enzima adsorvida ao suporte e dos menores efeitos difusionais presentes neste tipo de reação. Apenas a reação 12 apresenta um comportamento bastante diferenciado das demais, sendo considerada um *outlier*.

Novamente os erros experimentais foram mostrados apenas para a análise realizada na UFSCar e para o suporte comercial, de forma a facilitar a análise do gráfico.

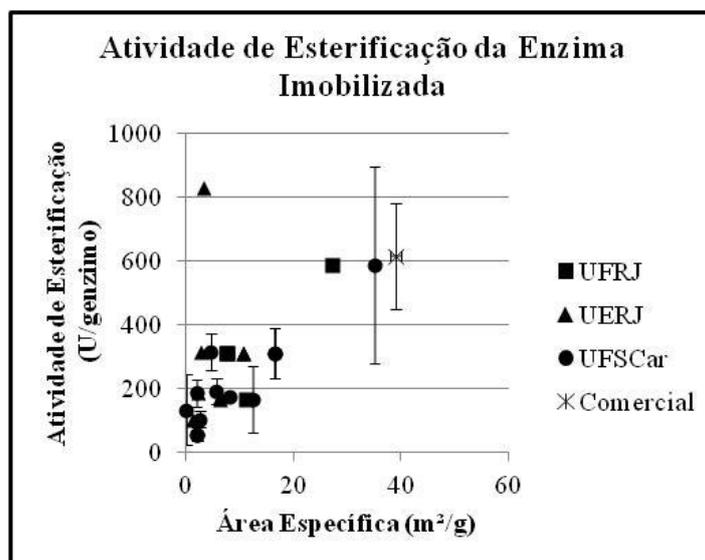
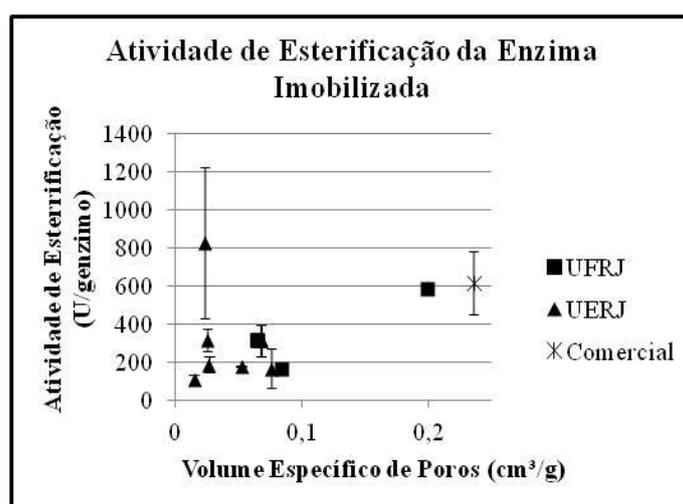


Figura 4.36. Efeito da área específica dos suportes na atividade de esterificação da enzima imobilizada.

Na Figura 4.37 a influência do volume específico de poros sobre a atividade de esterificação é apresentada. Observa-se comportamento similar ao encontrado para a área específica, inclusive para a reação 12. Apenas os erros experimentais associados à série de medidas obtida na UERJ e da amostra comercial são mostrados.



A relação existente entre o diâmetro médio de poro e a atividade de esterificação de cada um dos biocatalisadores é mostrada na Figura 4.38. Nota-se que, aparentemente, quanto menor é o diâmetro de poro, maior é a atividade de esterificação. Isso ocorre muito provavelmente porque menores diâmetros de poro estão associados a maiores áreas; logo, a maiores rendimento de imobilização, maiores quantidades de enzima adsorvida ao suporte e atividades mais elevadas. Como foram poucos os resultados obtidos na UFRJ, os erros associados à atividade de esterificação foram suprimidos para esta série, sendo mostrados apenas para a série da UERJ e para o suporte comercial.

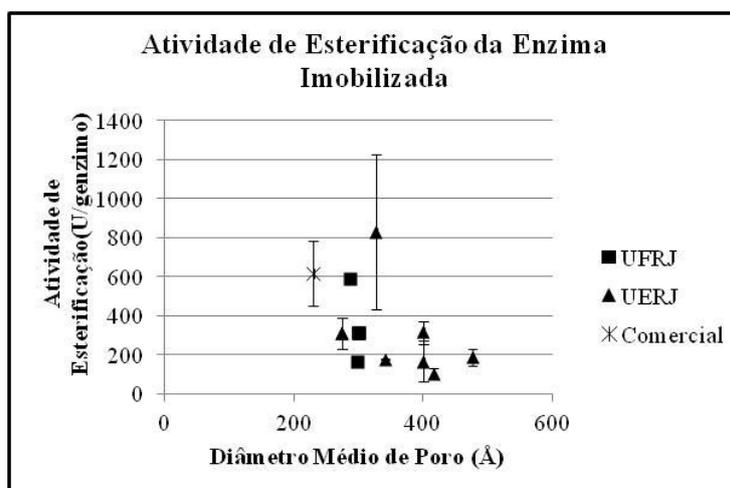


Figura 4.38. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes na atividade de esterificação da enzima imobilizada.

4.1.3. Modelagem

Com o objetivo de facilitar a visualização das correlações existentes entre as inúmeras variáveis envolvidas no sistema, foi montada uma matriz de correlação, apresentada na Tabela 4.8. As variáveis são consideradas como correlacionadas caso o coeficiente de correlação seja igual ou maior que 0,7 (SCHWAAB e PINTO, 2007). Quanto mais próximo de 1 é o coeficiente de correlação, mais correlacionadas são as variáveis.

A partir da análise da Tabela 4.8, é possível observar que o aumento da área está diretamente relacionado ao aumento do volume específico de poros e à diminuição do diâmetro médio de poro, como já observado. O aumento da atividade de esterificação é acompanhado pelo aumento da área específica e do volume específico de poros. O

aumento do rendimento está associado ao aumento da quantidade de proteína presente no suporte polimérico. Observa-se também que o aumento da massa de emulsificante é acompanhado pela diminuição do diâmetro médio das partículas emulsificadas. Essas correlações destacadas corroboram as análises propostas e discutidas anteriormente.

A matriz de correlação foi montada com os dados de área obtidos a partir da UFSCar, uma vez que foi possível a obtenção de todos os resultados de área para todos os suportes sintetizados. Os valores empregados para o diâmetro médio de poro e o volume específico de poros foram obtidos a partir da UFRJ e da UERJ. Caso o suporte tenha sido analisado em ambos os laboratórios (UFRJ e UERJ), o valor selecionado de diâmetro de poro e volume específico de poro foi o que apresentou valor de área mais próximos do valor obtido na UFSCar.

Com base nos resultados obtidos, procurou-se descrever as atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores como função das características morfológicas dos suportes produzidos. Assim, foram desenvolvidos dois modelos empíricos capazes de descrever as atividades das enzimas imobilizadas. O modelo da atividade de hidrólise é apresentado na Tabela 4.9 e o da atividade de esterificação é mostrado na Tabela 4.10. Os parâmetros também são mostrados, assim como os valores de *p-level*. Quanto menor o valor de *p-level*, mais significativo é o parâmetro, enquanto valores acima de 0,05 indicam uma possível insignificância do parâmetro em questão. Para o desenvolvimento dos modelos foram considerados os valores de área específica, volume específico de poros e diâmetro médio de poros obtidos a partir das análises realizadas apenas na UERJ, com o objetivo de descrever de forma mais precisa o comportamento dos biocatalisadores a partir de um único conjunto consistente de dados. Vale ressaltar que os dados correspondentes à reação 12 não foram considerados na elaboração dos modelos em função do desvio observado nas análises de atividade de hidrólise e de esterificação.

Tabela 4.8. Matriz de correlação entre as diferentes variáveis envolvidas no sistema.

	V	ME	MI	Sesp	Vesp	Dp	Rendimento	Uimo Hidro.	Uimo Ester.	Retenção Hid.	Conc. Ptn.	dp
V	1,00	0,04	0,00	-0,35	-0,61	0,34	-0,42	-0,53	-0,26	-0,14	-0,34	-0,12
ME	0,04	1,00	-0,02	-0,07	-0,12	0,19	0,01	0,13	0,19	0,10	0,01	-0,78
MI	0,00	-0,02	1,00	0,24	0,24	-0,32	0,07	-0,11	-0,03	-0,11	0,06	-0,08
Sesp	-0,35	-0,07	0,24	1,00	0,96	-0,74	0,64	0,14	0,89	-0,41	0,73	-0,02
Vesp	-0,61	-0,12	0,24	0,96	1,00	-0,56	0,44	0,18	0,85	-0,37	0,55	-0,24
Dp	0,34	0,19	-0,32	-0,74	-0,56	1,00	-0,47	-0,73	-0,61	-0,20	-0,68	-0,07
Rendimento	-0,42	0,01	0,07	0,64	0,44	-0,47	1,00	-0,01	0,71	-0,64	0,96	0,26
Uimo Hidro	-0,53	0,13	-0,11	0,14	0,18	-0,73	-0,01	1,00	0,20	0,66	0,02	-0,24
Uimo Ester	-0,26	0,19	-0,03	0,89	0,85	-0,61	0,71	0,20	1,00	-0,37	0,78	-0,09
Retenção Hid.	-0,14	0,10	-0,11	-0,41	-0,37	-0,20	-0,64	0,66	-0,37	1,00	-0,68	-0,33
Conc. Ptn.	-0,34	0,01	0,06	0,73	0,55	-0,68	0,96	0,02	0,78	-0,68	1,00	0,26
dp	-0,12	-0,78	-0,08	-0,02	-0,24	-0,07	0,26	-0,24	-0,09	-0,33	0,26	1,00

Pode-se observar que o modelo apresentado para a atividade hidrolítica na Tabela 4.9 é bastante satisfatório, apresentando coeficiente de correlação de 0,97. Na Figura 4.39 é mostrada a relação existente entre as atividades de hidrólise e as atividades previstas pelo modelo. O resultado obtido reforça a ideia de que o modelo proposto é satisfatório. Todos os parâmetros apresentados no modelo são significativos. Pode-se notar que o aumento da atividade de hidrólise está associado ao aumento da área e do diâmetro médio de poro. Resultados que diferem da análise gráfica, contudo, como já mencionado, para a elaboração dos modelos apenas as análises realizadas na UERJ foram consideradas. O aumento da área está relacionado à maior quantidade de enzima retida no suporte, apresentando o biocatalisador uma maior atividade. Além disso, o maior diâmetro de poro facilita a difusão de substratos e produtos, podendo refletir em uma maior atividade enzimática.

Tabela 4.9. Modelo empírico que descreve a atividade hidrolítica da enzima imobilizada.

Equação				
$U_{\text{imoHidro}} = a_0 + a_1 \cdot S_{\text{esp}} + a_2 \cdot D_p + b_{12} \cdot V_{\text{esp}} \cdot D_p$				
Parâmetros Estimados (R=0,97; Grau de Liberdade=2)				
Parâmetros	a0 (U.g ⁻¹)	a1 (U.m ⁻²)	a2 (10 ¹⁰ .U.(g.m) ⁻¹)	b12 (10 ¹⁶ .U.m ⁻⁴)
Valores Estimados	-11,12	1,06	0,03	-0,21
Desvio Padrão	3,93	0,21	0,01	0,04
p-level	0,048	0,007	0,032	0,008

sendo: U_{imoHidro} , a atividade de hidrólise da enzima imobilizada (U/g); S_{esp} , a área específica das partículas do suporte (m²/g); D_p , o diâmetro médio de poro (Å); V_{esp} , o volume específico de poros (cm³/g).

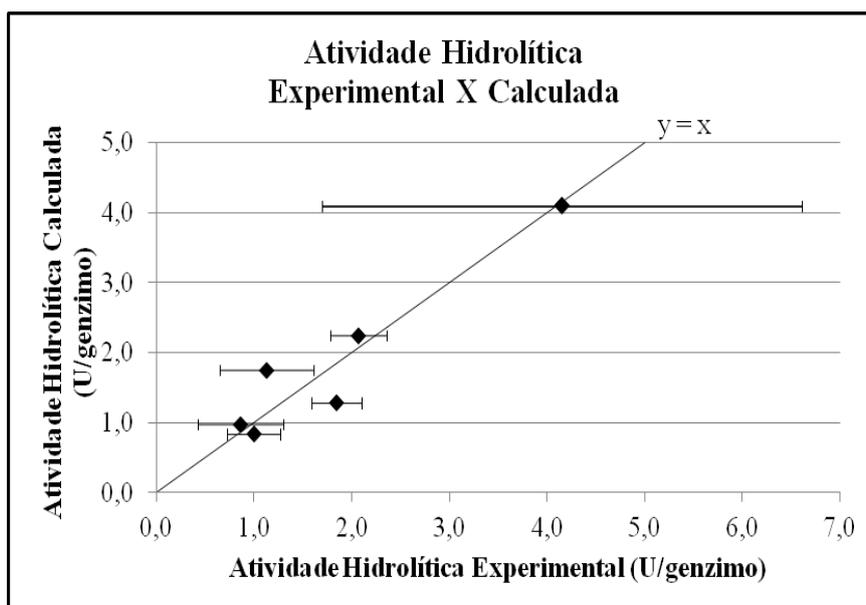


Figura 4.39. Relação entre as variáveis observadas e as previstas pelo modelo de atividade de hidrólise.

A partir da análise do modelo que descreve a atividade de esterificação, mostrado na Tabela 4.10, é possível perceber um ajuste menos satisfatório aos dados experimentais ($R=0,78$). Na Figura 4.40 é mostrada a relação existente entre as atividades de esterificação e as atividades previstas pelo modelo. Pode-se perceber que ao considerar os erros experimentais, inerentes às análises de esterificação, o ajuste torna-se mais satisfatório. Os valores de *p-level* para todos os parâmetros obtidos encontram-se acima de 0,05. Esses resultados podem ser explicados pelos erros experimentais observados e também pela presença outros fatores influentes na atividade de esterificação e que não estão sendo considerados no modelo em questão. Contudo, é possível perceber um máximo de atividade em relação à área apresentada pelos suportes. Este comportamento também difere do comportamento observado a partir dos gráficos apresentados anteriormente, mas vale ressaltar que apenas os dados obtidos a partir da UERJ estão sendo considerados.

Tabela 4.10. Modelo empírico que descreve a atividade de esterificação da enzima imobilizada.

Equação					
$UimoEster = a0 + a2 * Dp + b11 * Sesp * Sesp + b12 * Vesp * Dp + b13 * Sesp * Dp$					
Parâmetros Estimados (R=0,78; Grau de Liberdade=1)					
Parâmetros	a1 (U.g ⁻¹)	a2 (10 ¹⁰ .U.(g.m) ⁻¹)	b11 (U.g.m ⁻⁴)	b12 (10 ¹⁶ .U.m ⁻⁴)	b13 (10 ¹⁰ .U.m ⁻³)
Valores Estimados	-322,75	1,07	-0,77	-21,90	0,29
Desvio Padrão	792,49	1,72	3,24	21,88	0,33
p-level	0,711	0,578	0,827	0,390	0,445

sendo: UimoEster, a atividade de esterificação da enzima imobilizada (U/g); Sesp, a área específica das partículas do suporte (m²/g); Dp, o diâmetro médio de poro (Å); Vesp, o volume específico de poros (cm³/g).

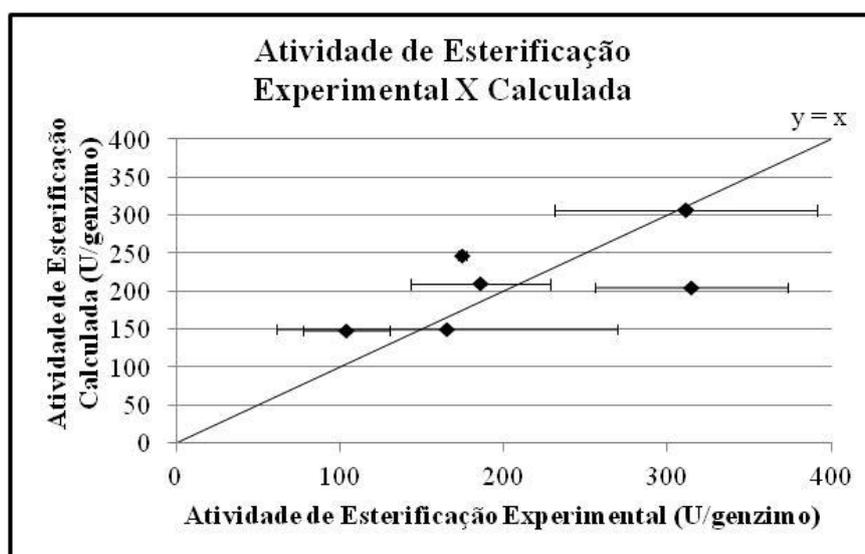


Figura 4.40. Relação entre as variáveis observadas e as previstas pelo modelo de atividade de esterificação.

4.2. Segundo Bloco Experimental

De acordo com os resultados obtidos até aqui, as atividades enzimáticas dependem fundamentalmente da área específica dos suportes produzidos, que por sua vez depende essencialmente da quantidade de polímero depositada na casca. Segundo os

dados obtidos, as áreas específicas podem ser controladas pela vazão de alimentação da emulsão, pela quantidade de iniciador e de emulsificante, havendo uma condição ótima de operação.

Em função dos resultados encontrados, uma segunda série de experimentos foi traçada com o objetivo de validar os modelos desenvolvidos. Para isso, uma quarta variável foi estudada: a quantidade de monômero alimentada na etapa da emulsão. A quantidade de monômero adicionada está relacionada ao grau de cobertura das partículas, o que pode provocar alterações ainda mais apreciáveis na morfologia das partículas casca-núcleo e mudanças significativas na área específica.

4.2.1. Influência da Massa de Monômero Alimentada nas Partículas Poliméricas

O segundo bloco de experimentos foi traçado com base nos resultados obtidos a partir do primeiro grupo experimental. Primeiramente, foram selecionadas duas condições operacionais do primeiro bloco: a que resultou na maior área específica para o suporte final e a que resultou na menor área específica. A reação na qual foi empregada uma vazão flutuante originou suportes com as maiores áreas; contudo, essa variável operacional não foi controlada. Dessa forma, as reações utilizadas como referência foram a reação 03, com maior área, e a reação 10, como menor área específica.

Foram propostos, assim, dois blocos distintos de experimentos: um bloco de reações conduzido em torno da reação que resultou em maior área específica e outro bloco de reações em torno da reação que resultou na menor área específica para os suportes produzidos. As condições experimentais empregadas em cada uma das reações são apresentadas na Tabela 4.11. A legenda apresentada é baseada nas condições de referência determinadas por BESTETI (2011), sendo atribuído o valor 0 para as condições de referência.

Os erros foram calculados com base nas aferições de reações que possuíam o mesmo valor nominal para uma determinada variável, como apresentado na Tabela 3.1 do Capítulo 03. Apesar de cada variável apresentar uma variância intrínseca associada, foi considerado nas análises que serão realizadas a seguir que as variáveis de entrada

não apresentam erro, uma vez que o desvio padrão relacionado a cada uma delas pode ser considerado pequeno.

Tabela 4.11. Valor real das variáveis operacionais nas diferentes reações realizadas.

Reação	Descrição	Legenda	Vazão (l/h)	Massa de Emulsificante (g)	Massa de Iniciador (g)	Massa de Monômero na Alimentação (g)
13	Reação 10 com menos monômero na alimentação	- Iniciador; - Monômero	0,027±0,007	2,506±0,005	0,2260±0,0001	18,5±1,4
14	Reação 10 com mais monômero na alimentação	- Iniciador; + Monômero	0,031±0,007	2,507±0,005	0,2261±0,0001	116,4±5,1
15	Reação 03 com menos monômero na alimentação	0 Iniciador; - Monômero	0,028±0,007	2,508±0,005	0,304±0,002	19,5±1,4
16	Reação 03 com mais monômero na alimentação	0 Iniciador; + Monômero	0,030±0,007	2,502±0,005	0,303±0,002	120,0±5,1
17	Reação 03 - réplica	0 Iniciador; 0 Monômero	0,034±0,007	2,509±0,005	0,305±0,002	70,029±0,007
18	Reação 10 - réplica	- Iniciador; 0 Monômero	0,036±0,007	2,503±0,005	0,2260±0,0001	70,024±0,007

O rendimento obtido para cada uma das reações realizadas é apresentado na Figura 4.41. Percebe-se, tanto para as reações com menos iniciador quanto para as reações com mais iniciador, que o aumento na quantidade de monômero alimentado provoca um aumento no rendimento reacional. Provavelmente, o aumento na quantidade de monômero provoca um aumento no número de partículas formadas promovendo maior aglomeração entre as partículas emulsificadas e entre elas e os núcleos,

resultando em maior rendimento. Apenas a reação 18 (- Iniciador; 0 Monômero) apresentou rendimento um pouco menor do que o esperado. As reações conduzidas sob condições similares às do primeiro bloco (reações 17 e 18) apresentaram certa discrepância em relação aos valores obtidos para o rendimento reacional (reações 03 e 10 respectivamente).

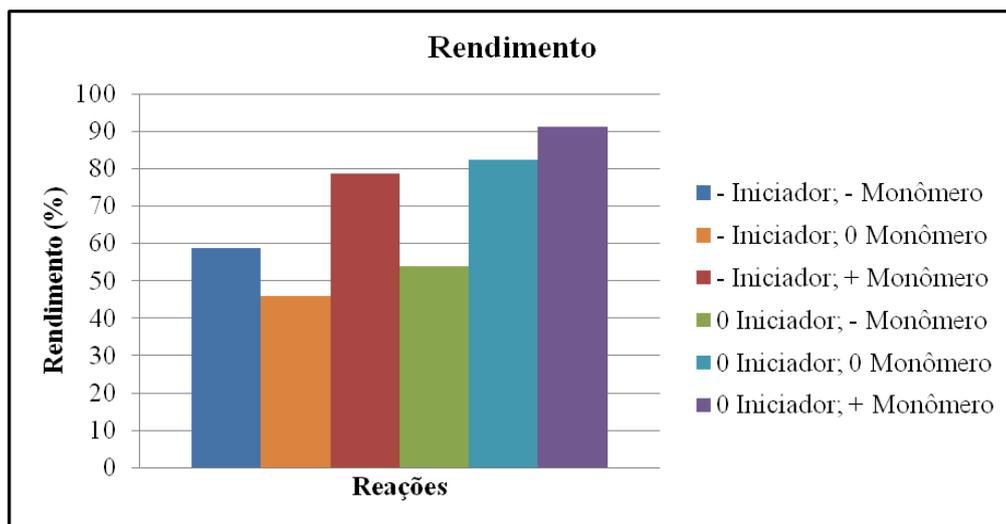


Figura 4.41. Rendimento correspondente a cada uma das reações realizadas no segundo bloco de experimentos.

Os dados cinéticos da conversão de monômero também foram determinados ao longo das reações, de forma a acompanhar a evolução dinâmica da conversão em cada reação, como é apresentado na Figura 4.42. Observa-se novamente que as diferentes reações apresentam conversões similares na etapa de suspensão, em torno de (70-80)%, a depender da reação. Contudo, é possível notar que, ao iniciar a etapa de emulsão alimentada, as conversões obtidas oscilam de maneira considerável. Isso ocorre, como já foi mencionado anteriormente, em função da dificuldade encontrada para retirar alíquotas representativas do meio reacional, uma vez que ao longo do processo parte das partículas e são formados também pequenos aglomerados.

4.2.1.1. Distribuições de Massas Molares

As distribuições das massas molares, tanto das partículas do sobrenadante quando das partículas casca-núcleo para este segundo bloco reacional, também foram

analisadas. Na Figura 4.43 são apresentadas as distribuições de massas molares das partículas do sobrenadante. Nota-se que o aumento na quantidade de monômero alimentado provoca o aumento expressivo das massas molares. Quanto mais monômero é alimentado, maior é a probabilidade de propagação e mais expressivo é o crescimento das cadeias poliméricas; logo, maiores são as massas molares obtidas. Não foi possível obter a distribuição de massas molares para a reação 16, possivelmente porque ao final da reação praticamente não havia partículas em emulsão (o teor de sólidos presentes no sobrenadante foi de apenas 0,47 %). Ao comparar as distribuições das reações 17 (0 Iniciador; 0 Monômero) e 18 (- Iniciador; 0 Monômero) com as das reações 03 e 10, respectivamente, observa-se que cada par de reações apresenta distribuições semelhantes. As duas séries que apresentam 01 ao lado correspondem às reações 03 e 10 do primeiro bloco reacional.

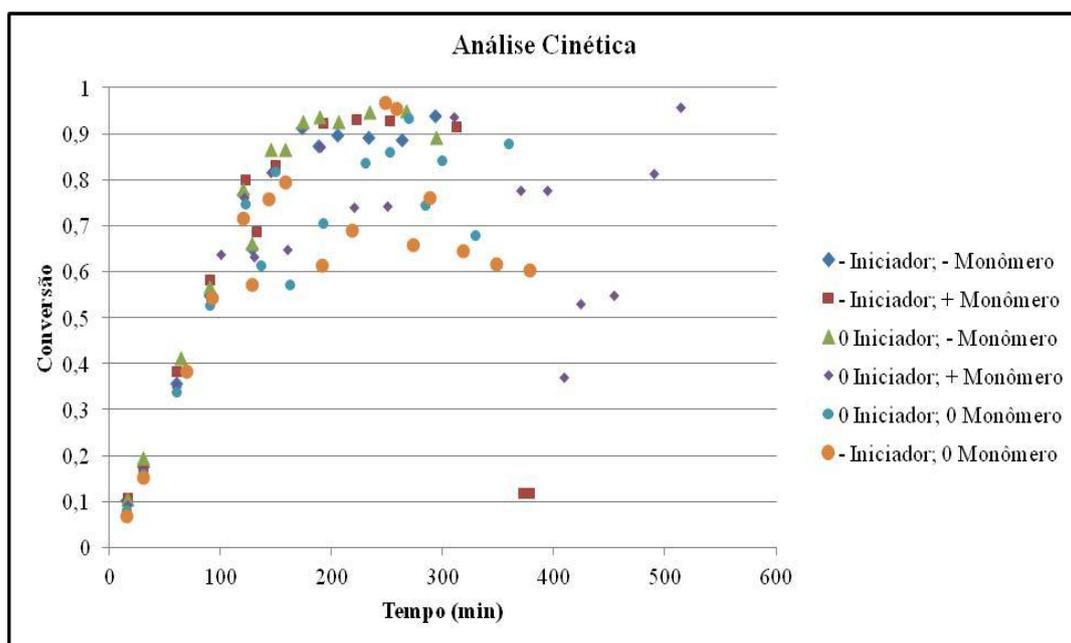


Figura 4.42. Análise cinética das reações realizadas no segundo bloco experimental.

Na Tabela 4.12 são mostradas as massas molares ponderais médias (M_n e M_w) das partículas produzidas, acompanhadas dos respectivos índices de polidispersão. Pode-se notar que o aumento na quantidade de monômero provoca o aumento da massa molar ponderal média (M_w) e também do índice de polidispersão. Nota-se também um leve aumento no valor de M_n com o aumento da quantidade de monômero alimentada, indicando um deslocamento pouco pronunciado das curvas de distribuição para valores

maiores. Esse comportamento é observado muito provavelmente em função da larga distribuição de massas molares, possivelmente indicando a formação de maior quantidade de polímero, incluindo os de maior maior massa molar, na emulsão, como esperado.

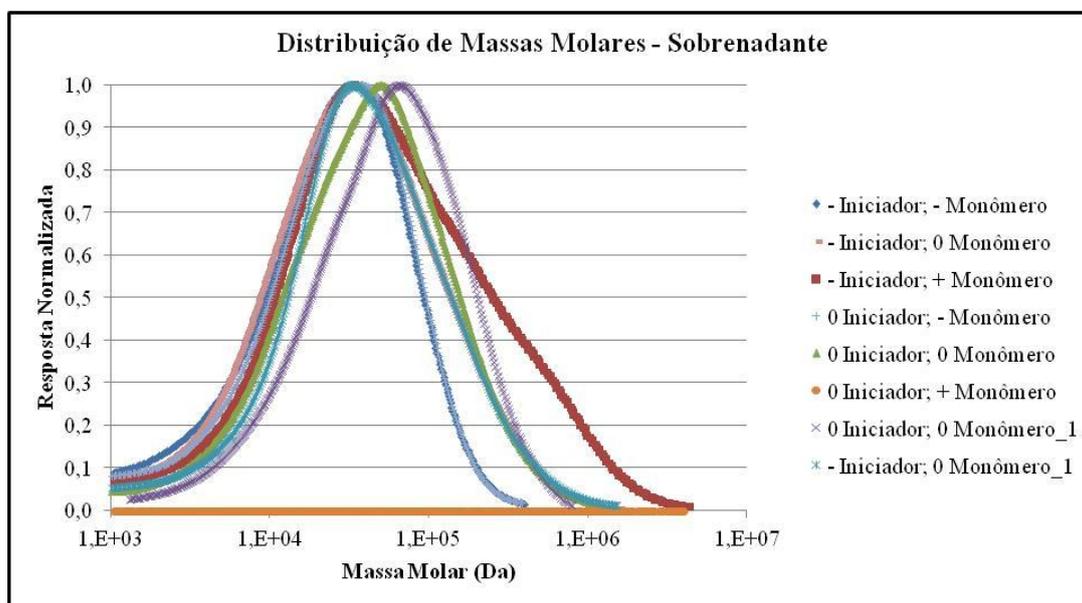


Figura 4.43. Distribuições de massas molares das partículas emulsificadas do segundo bloco de experimentos.

Tabela 4.12. Valores das massas molares ponderais médias (Mn e Mw) e valores dos índices de polidispersão (IP) relativos às partículas do sobrenadante nas reações do segundo bloco experimental.

Reação	Legenda	Mw (Da)	Mn (Da)	IP (-)
13	- Iniciador; - Monômero	3,8E+04	1,4E+04	2,6
14	- Iniciador; + Monômero	1,1E+05	2,9E+04	4,6
15	0 Iniciador; - Monômero	3,9E+04	1,8E+04	2,1
16	0 Iniciador; + Monômero	-	-	-
17	0 Iniciador; 0 Monômero	7,7E+04	2,2E+04	3,5
18	- Iniciador; 0 Monômero	5,6E+04	1,7E+04	3,3

A mesma análise foi realizada para as partículas casca-núcleo obtidas ao final de cada reação, como pode ser observado na Figura 4.44. Observa-se que o aumento na quantidade de monômero alimentado provoca um alargamento das curvas de distribuição e um aumento nas massas molares das partículas poliméricas, comportamento similar ao observado para as distribuições das massas molares das partículas presentes no sobrenadante. Nota-se também que os suportes resultantes das reações 17 (0 Iniciador; 0 Monômero) e 18 (- Iniciador; 0 Monômero), quando comparados com os suportes, 03 e 10, respectivamente, apresentam distribuições muito próximas, embora estas últimas apresentem leve deslocamento no sentido de maiores massas molares. Novamente duas séries obtidas no primeiro bloco, possuem 01 na legenda, são apresentadas, com o objetivo de facilitar a comparação com as demais análises. É possível notar um comportamento bimodal para partículas produzidas com uma maior quantidade de monômero na etapa de alimentação

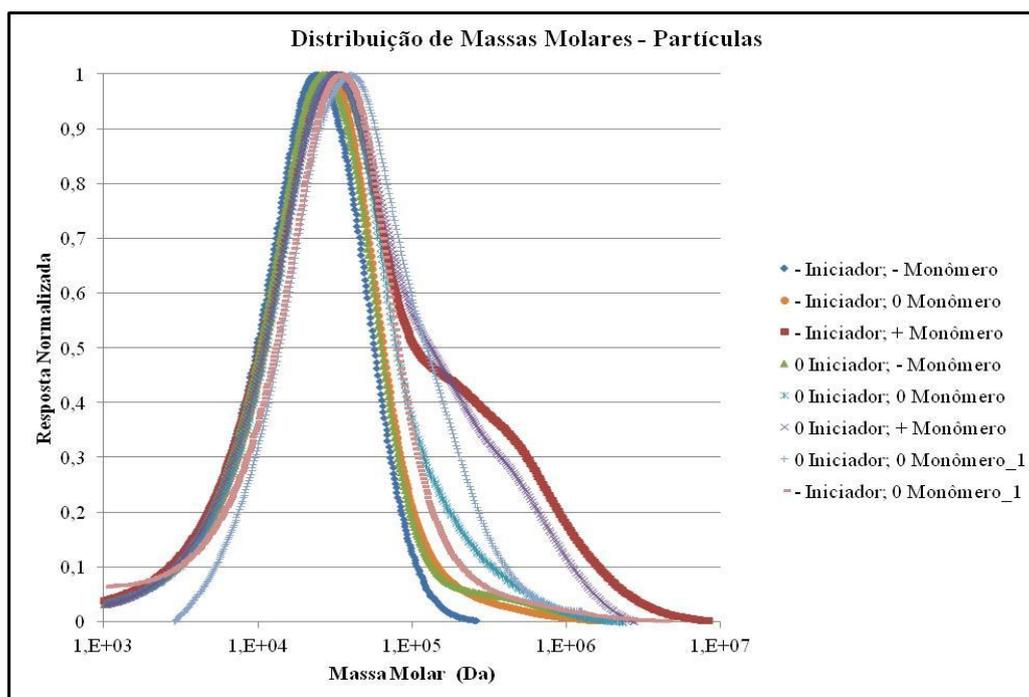


Figura 4.44. Distribuições de massas molares das partículas casca-núcleo.

A Tabela 4.13 apresenta as massas molares ponderais médias (M_n e M_w) das partículas casca-núcleo produzidas acompanhadas pelos índices de polidispersão. Nota-se a mesma tendência observada para as partículas emulsificadas, em que o aumento na quantidade de monômero alimentado provoca o aumento dos índices de polidispersão e

o aumento das massas molares ponderais médias (Mn e Mw). Em função da larga distribuição de massas molares, o valor de Mw é afetado de forma mais significativa que o valor de Mn. Isso ocorre provavelmente pela formação de maiores quantidades de polímero na emulsão, que possivelmente permanece mais tempo em emulsão. Como no caso do primeiro bloco de experimentos, há grande semelhança entre as distribuições de massas molares do polímero contido no sobrenadante e nas partículas casca-núcleo, o que indica forte interação entre as fases.

Tabela 4.13. Valores das massas molares ponderais médias (Mn e Mw) e valores dos índices de polidispersão (IP) relativos a cada uma das partículas casca-núcleo produzidas a partir das reações do segundo bloco.

Reação	Legenda	Mw (Da)	Mn (Da)	IP (-)
13	- Iniciador; - Monômero	2,8E+04	1,3E+04	2,2
14	- Iniciador; + Monômero	1,2E+05	1,7E+04	7,1
15	0 Iniciador; - Monômero	3,8E+04	1,3E+04	2,8
16	0 Iniciador; + Monômero	9,5E+04	1,7E+04	5,5
17	0 Iniciador; 0 Monômero	5,2E+04	1,6E+04	3,3
18	- Iniciador; 0 Monômero	3,7E+04	1,5E+04	2,5

4.2.1.2. Temperaturas de Transição Vítrea

As partículas casca-núcleo foram caracterizadas quanto as temperaturas de transição vítrea, apresentadas na Tabela 4.14. Percebe-se que os valores das temperaturas de transição vítrea das partículas produzidas são muito similares entre si e com os valores medidos no primeiro bloco de experimentos, indicando estruturas semelhantes e massas molares suficientemente altas. Observa-se, contudo, uma leve tendência de aumento no valor da temperatura de transição vítrea com o aumento da massa de monômero alimentado, por causa das maiores massas molares. Cada uma das curvas de DSC obtidas é mostrada no Apêndice B.

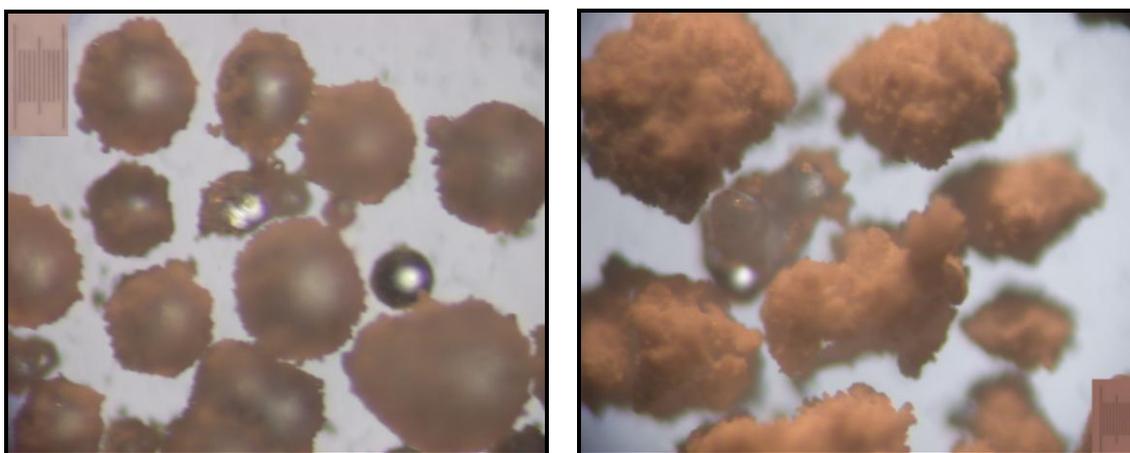
Tabela 4.14. Valores das temperaturas de transição vítrea das partículas produzidas.

Reação	Tg (°C)	Referência Apêndice B
13	96,6	Figura B.12
14	102,2	Figura B.13
15	98,4	Figura B.14
16	101,9	Figura B.15
17	99,3	Figura B.16
18	99,4	Figura B.17

4.2.1.3. Morfologia das Partículas Poliméricas

A morfologia das partículas sintetizadas neste segundo bloco de reações foi novamente avaliada com base nas análises de microscopia. O efeito da quantidade de monômero alimentada na morfologia de tais partículas também foi avaliado.

A Figura 4.45 apresenta micrografias ópticas de partículas produzidas nas reações pertencentes ao grupo em que foi empregada a quantidade de iniciador de referência. Pode-se perceber que, com o aumento na quantidade de monômero alimentado, ocorre maior aglomeração das partículas e um aumento no grau de recobrimento.



(A)

(B)

Figura 4.45. Morfologia das partículas poliméricas produzidas:

(A) (0 Iniciador; - Monômero); (B) (0 Iniciador; + Monômero). O tamanho da régua é igual a 100 μm .

As micrografias de MEV das partículas produzidas nas diferentes reações realizadas são mostradas nas Figuras 4.46 e 4.47. Ao observar a figura na qual menos iniciador foi utilizado, percebe-se o maior grau de recobrimento das partículas com o aumento de monômero adicionado. Ao analisar as partículas produzidas a partir de reações em que uma maior quantidade de iniciador foi empregada, percebe-se que o aumento na quantidade de monômero provoca uma maior aglomeração das partículas e também um maior recobrimento desses aglomerados formados.

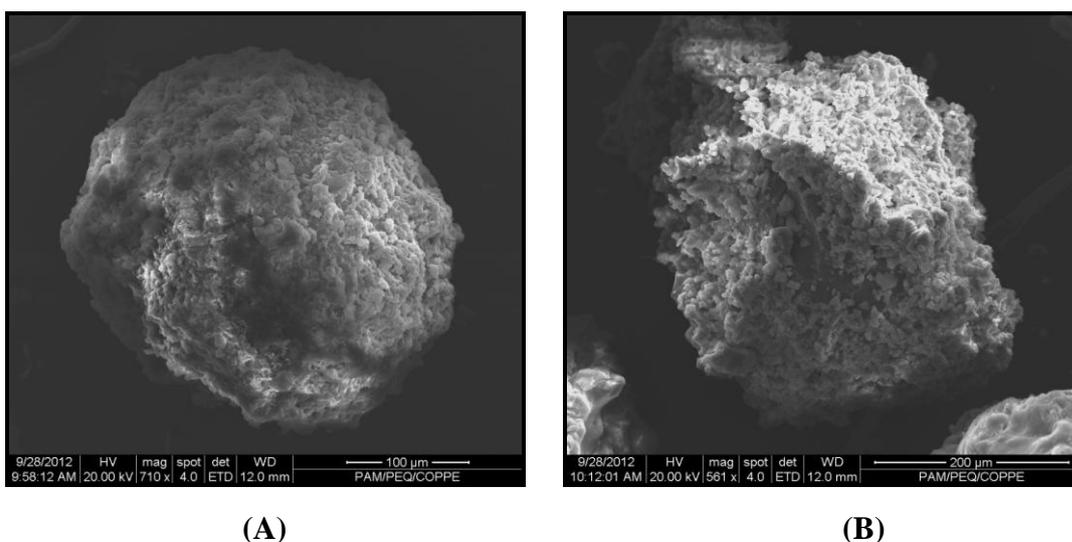


Figura 4.46. Microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas:
(A) (- Iniciador; - Monômero); (B) (- Iniciador; + Monômero).

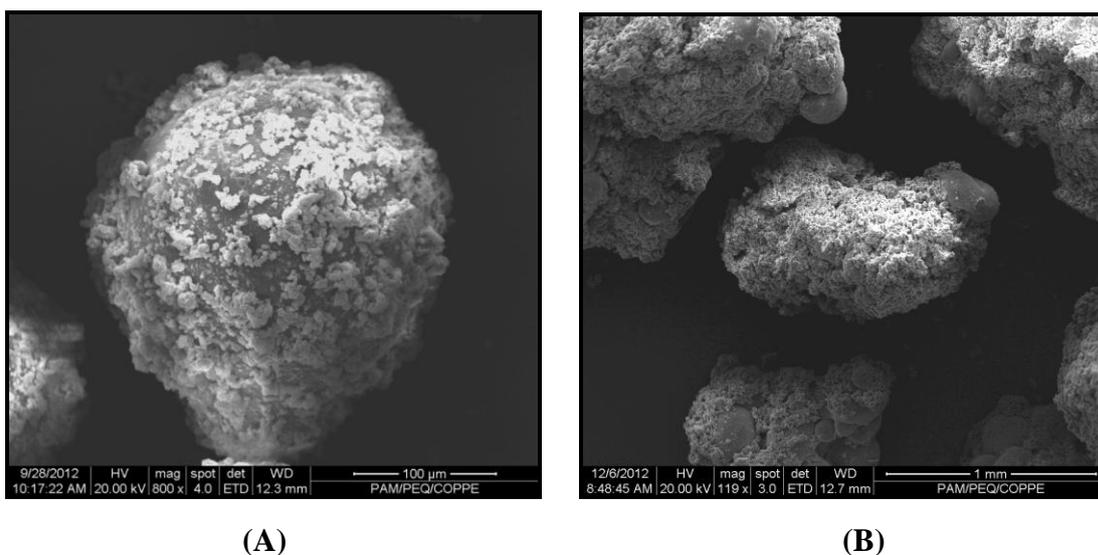


Figura 4.47. Microscopia eletrônica de varredura das partículas produzidas:
(A) (0 Iniciador; - Monômero); (B) (0 Iniciador; + Monômero).

4.2.1.3.1. Distribuição de Tamanhos de Partícula

As distribuições de tamanhos das partículas emulsificadas também foram analisadas. Dessa forma, foi possível observar de que forma a quantidade de monômero adicionada ao meio afeta as distribuições de tamanhos dessas partículas do látex. Na Figura 4.48, observa-se o efeito da quantidade de monômero adicionada, considerando o grupo de reações em que foi empregada menor quantidade de iniciador. Nota-se que o aumento na quantidade de monômero provoca um leve alargamento das curvas de distribuição de tamanhos. Na reação 14 (- Iniciador; + Monômero), em que mais monômero foi alimentado, praticamente não houve detecção de partículas em emulsão, por causa da aglomeração pronunciada do material produzido em emulsão, estando acima do limite de detecção do equipamento.

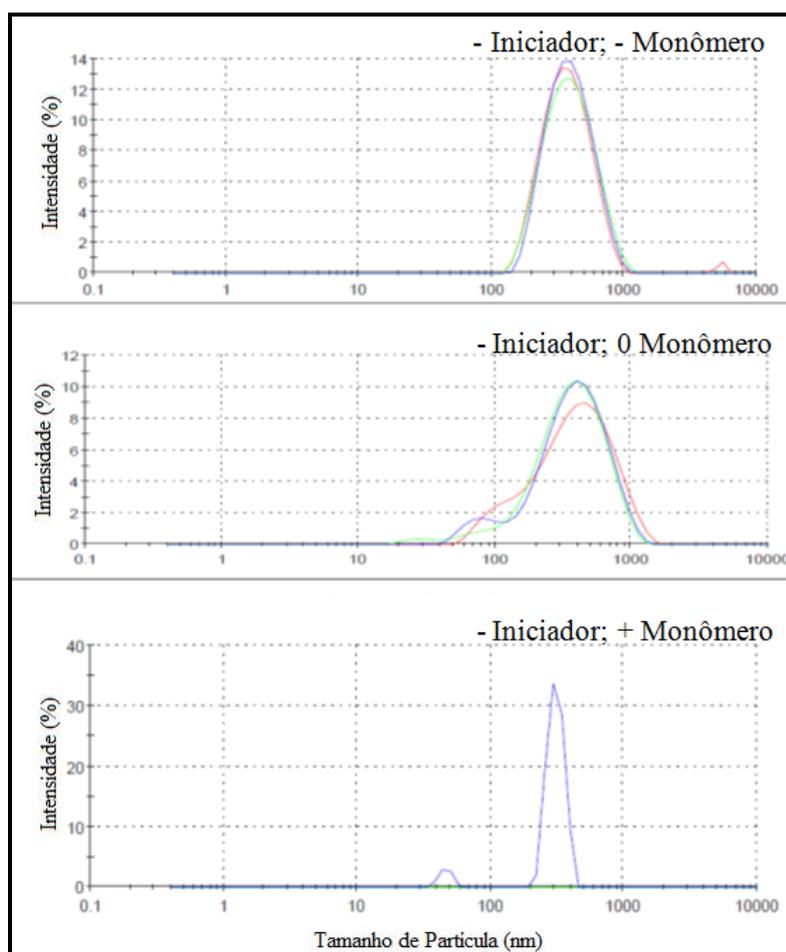


Figura 4.48. Efeito da quantidade de monômero nas partículas emulsificadas produzidas com menor quantidade de iniciador.

É possível notar também o efeito da quantidade de monômero adicionada às reações em que mais iniciador foi empregado. Esses resultados são apresentados na Figura 4.49. Percebe-se que o aumento na quantidade de monômero praticamente não afeta a distribuição de tamanhos das partículas emulsificadas. Como a quantidade de emulsificante empregada nas reações encontra-se acima da CMC, as partículas emulsificadas são devidamente estabilizadas. Esses resultados confirmam os resultados obtidos para o primeiro bloco de experimentos, que mostram que a morfologia das partículas emulsificadas é pouco dependente das condições operacionais investigadas. Esses resultados sugerem também a existência de uma forte interação entre o núcleo e as partículas emulsificadas e a possível origem relacionada aos desprendimentos de partículas da casca por conta dos campos de cisalhamento do reator.

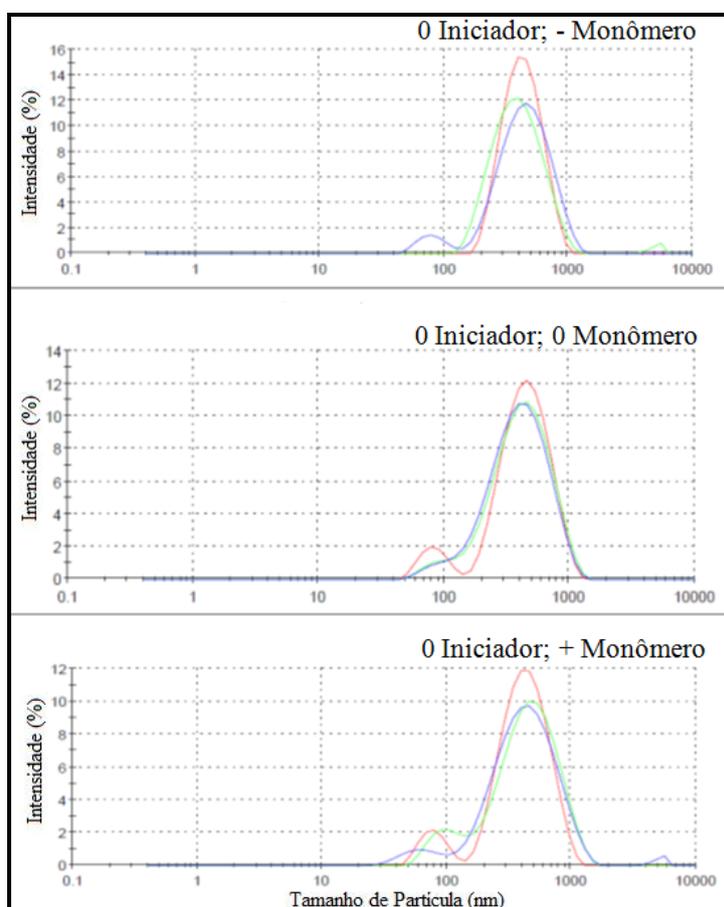


Figura 4.49. Efeito da quantidade de monômero nas partículas emulsificadas produzidas com mais iniciador, a quantidade de referência.

Os valores dos diâmetros médios das partículas emulsificadas obtidos para cada uma das reações deste segundo bloco de experimentos são apresentados na Tabela 4.15, com exceção da reação 14 que apresentou tamanhos de partícula acima do limite de detecção do equipamento. Esses valores serão importantes para a interpretação do mecanismo de geração dos poros presentes na casca das partículas casca-núcleo.

Tabela 4.15. Valores dos diâmetros médios das partículas emulsificadas.

Reação	dp (nm)
13	315,5 ± 4,1
14	-
15	339,7 ± 2,6
16	313,4 ± 3,9
17	326,4 ± 1,0
18	283,8 ± 9,1

As distribuições de tamanhos das partículas casca-núcleo produzidas também foram analisadas. A Figura 4.50 mostra o efeito da quantidade de monômero alimentada sobre as distribuições de tamanhos das partículas produzidas nas reações em que houve o emprego de menor quantidade de iniciador. Observa-se que o aumento na quantidade de monômero provoca o alargamento das curvas de distribuição e o aumento de partículas com diâmetros maiores, como já poderia ser esperado. O aumento de partículas maiores é resultado do aumento da espessura da casca, uma vez que mais monômero é adicionado, e da maior aglomeração das partículas.

A Figura 4.51 ilustra o efeito da quantidade de monômero adicionada na distribuição de tamanhos das partículas produzidas a partir das reações em que houve o emprego de maior quantidade de iniciador. Nota-se uma distribuição de tamanhos mais larga nas partículas produzidas com a quantidade intermediária de monômero. Tanto o aumento quanto a diminuição da quantidade alimentada provocam o estreitamento das curvas de distribuição de tamanhos. Novamente, observa-se que a reação em que mais monômero foi empregado origina partículas com maiores diâmetros, em função do aumento da espessura da casca e da maior aglomeração das partículas. Além disso, percebe-se um aumento pronunciado de partículas menores quando a quantidade intermediária de monômero é alimentada. Possivelmente, sob esta condição, o sistema é

melhor estabilizado, havendo a formação de maior número de partículas pequenas em emulsão.

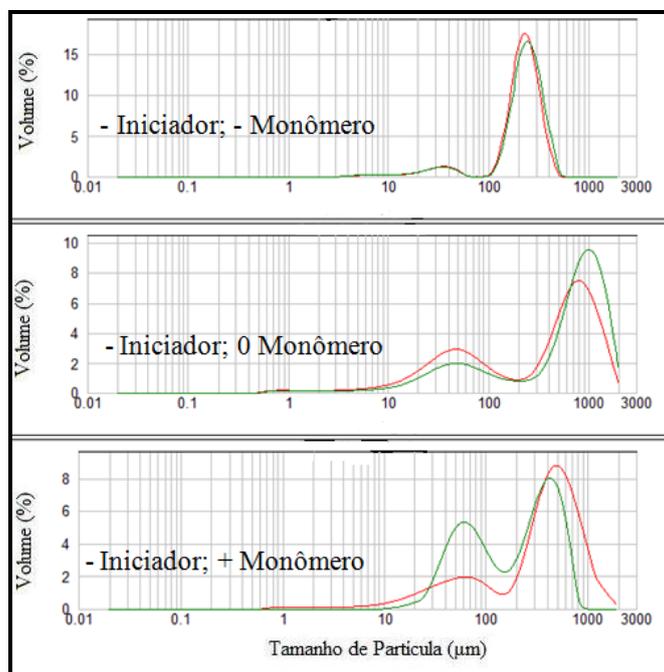


Figura 4.50. Efeito da quantidade de monômero alimentada na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo, considerando as reações com menos iniciador.

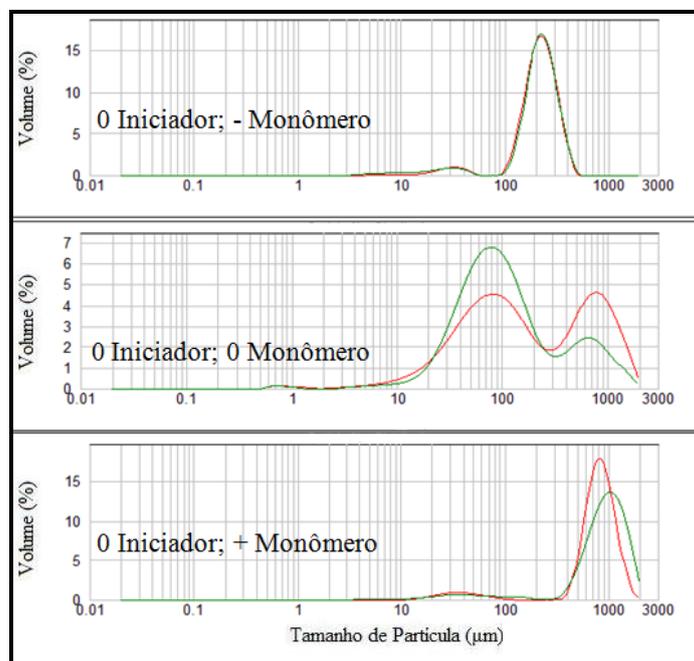


Figura 4.51. Efeito da quantidade de monômero alimentado na distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo, considerando as reações com mais iniciador.

4.2.1.3.2. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro, Volume Específico de Poros

A área específica, o volume específico de poros e o diâmetro médio de poro dos suportes produzidos também foram determinados e são apresentados na Tabela 4.16. Para este bloco de reações, as análises foram realizadas apenas na UERJ. Ao comparar os dados obtidos para as partículas produzidas a partir das reações 17 e 18 com os encontrados para as reações 03 e 10, respectivamente, percebe-se que os valores obtidos para o segundo par são similares, mas os valores de área específica e diâmetro médio de poro entre as reações 03 e 17 diferem. Ao analisar o efeito da quantidade de iniciador, o mesmo comportamento obtido para as reações 03 e 10 é encontrado para as reações 17 e 18. Contudo, quando se compara a área do suporte obtido na reação 17 com o resultado reportado por BESTETI (2009), em que a suspensão foi conduzida por 4h, nota-se que o valor encontrado é muito aquém do que deveria ser encontrado. Assim, apesar dos resultados morfológicos da reação 17 serem apresentados juntamente com os demais, estas propriedades são consideradas *outliers*.

Tabela 4.16. Resultados de área específica, volume específico de poros e diâmetro médio de poro para os suportes produzidos.

Reação	Legenda	Sesp (m ² /g)	Vesp (cm ³ /g)	Dp (Å)
13	- Iniciador; - Monômero	5,3	0,04	333,0
14	- Iniciador; + Monômero	13,1	0,09	263,7
15	0 Iniciador; - Monômero	1,9	0,01	291,8
16	0 Iniciador; + Monômero	4,3	0,03	300,4
17	0 Iniciador; 0 Monômero	4,4	0,08	373,7
18	- Iniciador; 0 Monômero	1,7	0,01	306,9

O efeito da massa de monômero na área específica dos suportes para os dois grupos reacionais (com menos e com mais iniciador) do segundo bloco de experimentos é mostrado na Figura 4.52. Nota-se que o aumento na quantidade de monômero provoca um aumento na área específica dos suportes, como era esperado. Apenas a área da reação 18 (-Iniciador; 0 Monômero) apresentou valor um pouco inferior ao esperado, que pode estar associado a um problema de amostragem. Este resultado corrobora a

ideia de que, quanto mais monômero é alimentado na etapa de emulsão alimentada, maior é o recobrimento do núcleo, maior é a espessura da casca e maior é a área específica apresentada pelos suportes.

Ao analisar o efeito da massa monomérica no volume específico de poros, também apresentado na Figura 4.52, percebe-se que o comportamento dos dois grupos é antagônico. No entanto, o comportamento da reação 17 deveria ser melhor investigado.

Na Figura 4.52, observa-se também que o aumento na quantidade de monômero é acompanhado pela queda do diâmetro médio de poro. Esse resultado corrobora a ideia de que o aumento da quantidade de monômero provoca o aumento do recobrimento do núcleo pelas partículas emulsificadas, reduzindo o diâmetro médio de poros a partir da maior deposição de partículas e maior a eficiência de aglomeração.

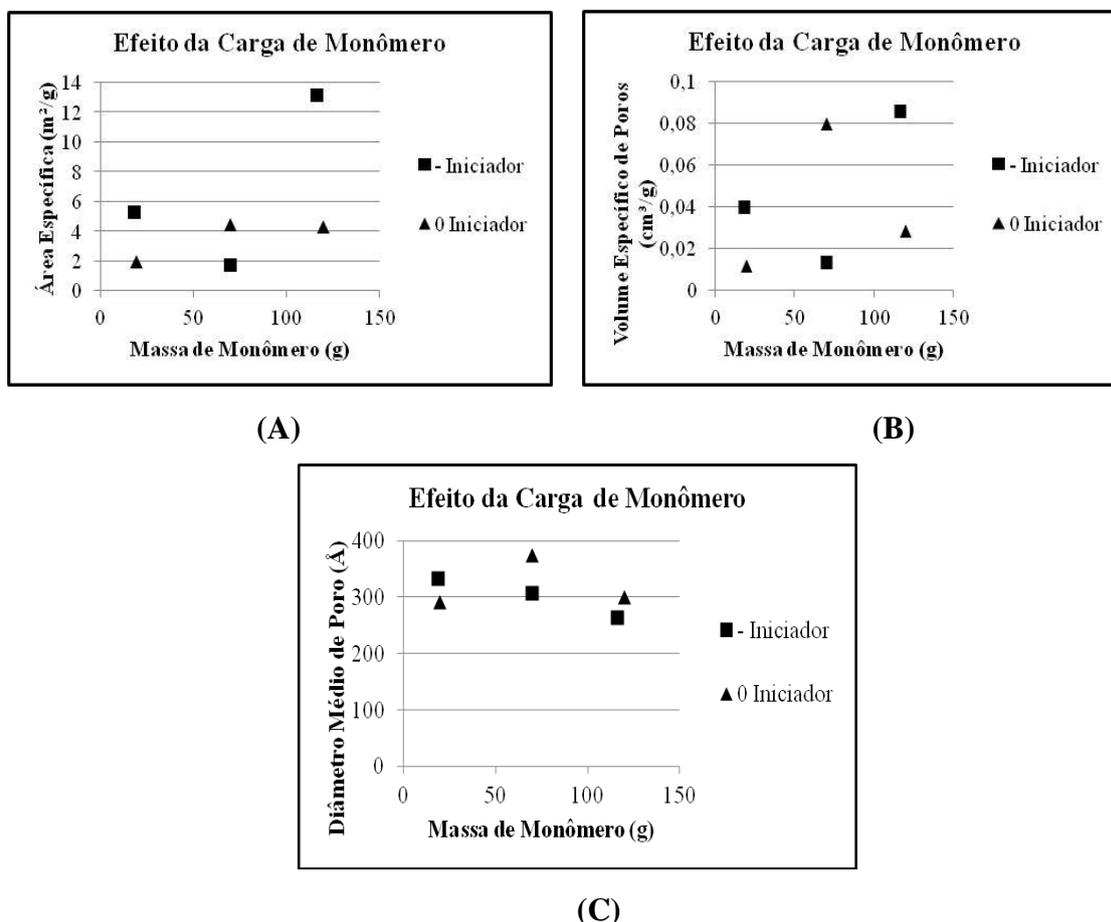


Figura 4.52. Efeito da massa de monômero alimentada nas características morfológicas dos suportes produzidos: **(A)** área específica; **(B)** volume específico de poros; **(C)** diâmetro médio de poro.

A relação existente entre as propriedades morfológicas dos suportes produzidos é mostrada na Figura 4.53, em que a área específica é relacionada ao volume específico de poros e ao diâmetro médio de poro. São observados comportamentos muito similares aos encontrados anteriormente para o primeiro bloco de experimentos. O aumento da área específica é acompanhado pelo aumento do volume específico de poros e pela diminuição do diâmetro médio de poro. Logo, esses resultados corroboram de forma substancial a interpretação de que o aumento da área está associado principalmente à quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo e não à morfologia dessas partículas. Novamente, a reação 17 apresenta um desvio em relação ao comportamento das demais.

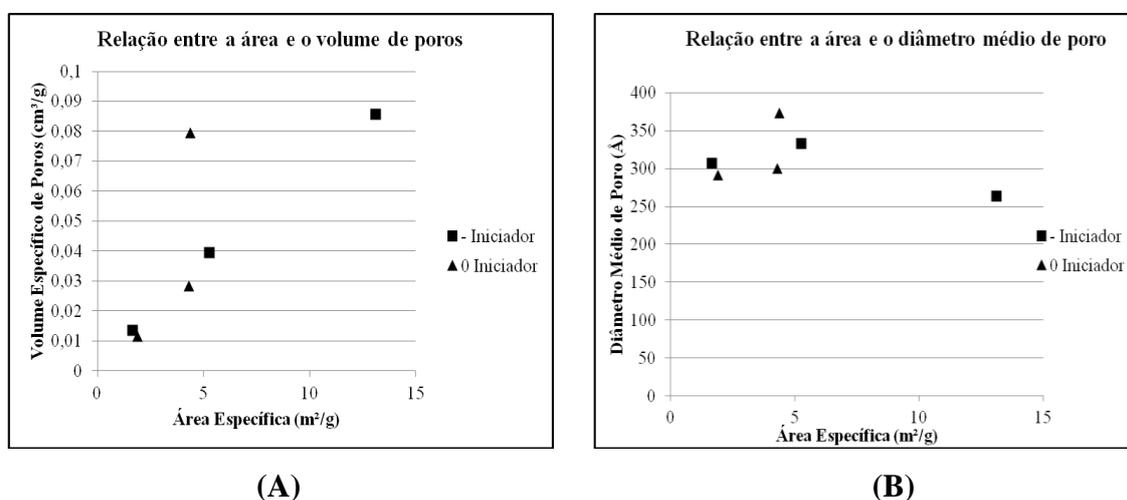


Figura 4.53. Relação existente entre área específica das partículas produzidas e (A) volume específico de poros e (B) diâmetro médio de poros.

BESTETI (2009) observou haver uma relação entre o diâmetro médio das partículas emulsificadas e o diâmetro médio de poro, uma vez que a deposição das partículas emulsificadas é responsável pela geração de poros nas partículas casca-núcleo. No entanto, esse estudo não foi realizado de forma sistemática. Foram apresentadas apenas algumas relações com suportes sintetizados a partir de diferentes monômeros, diferindo inclusive em relação aos componentes da casca e do núcleo. Assim, com o objetivo de facilitar a percepção da relação existente entre essas variáveis, são apresentadas as Figuras 4.54 e 4.55.

Segundo a Figura 4.55, não parece haver relação direta entre o diâmetro das partículas emulsificadas e o diâmetro médio de poro. Isso sugere que o mecanismo de

geração de poros, embora relacionado à deposição de partículas na casca, possa ser determinado por outros fatores, como a absorção de monômero do meio e a redução de volume provocada pela maior densidade do polímero.

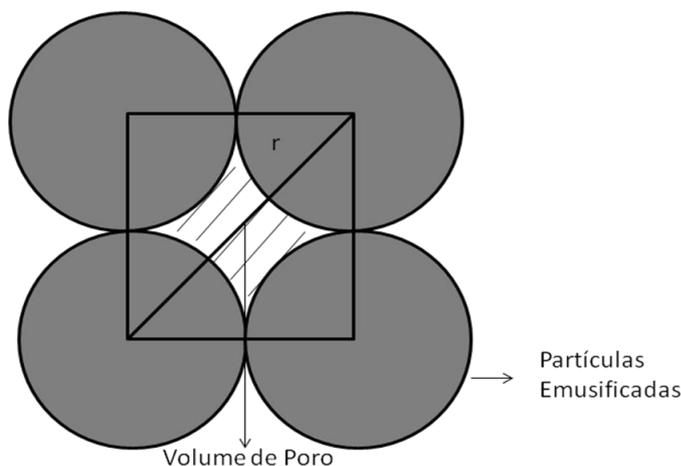


Figura 4.54. Relação existente entre o diâmetro médio de poro e o diâmetro médio das partículas emulsificadas.

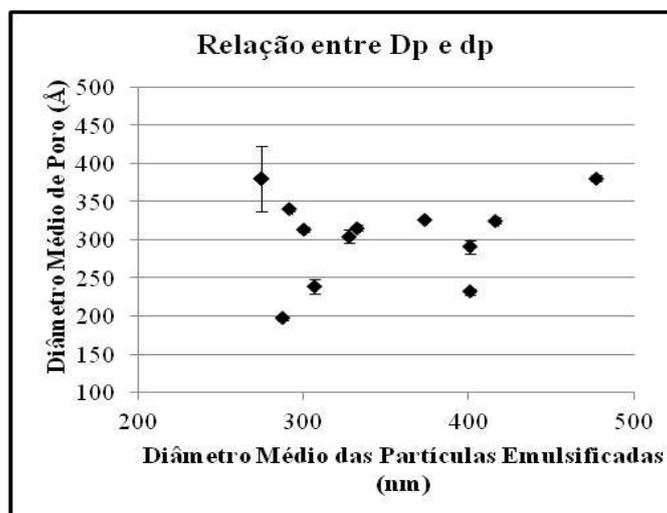


Figura 4.55. Relação encontrada entre o diâmetro médio de poro e o diâmetro médio das partículas emulsificadas.

4.2.2. Avaliação dos Parâmetros de Imobilização

Novas imobilizações enzimáticas foram realizadas nos seis novos suportes sintetizados. O valor da carga proteica inicial foi mantido. Na Figura 4.56 são

apresentadas as cinéticas de imobilização, baseadas na atividade hidrolítica, obtidas para cada uma das imobilizações realizadas. É possível notar que a maior parte dos suportes adsorve mais de 75% da carga inicial de enzima. As reações 15 (0 Iniciador; - Monômero) e 18 (- Iniciador; 0 Monômero) resultam em suportes com baixa capacidade de adsorção proteica, muito provavelmente em função de baixas áreas específicas obtidas.

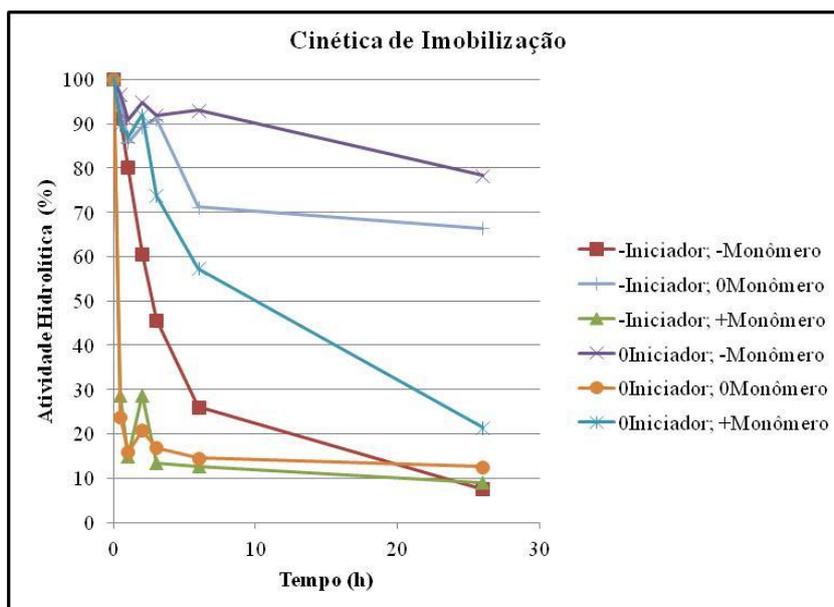


Figura 4.56. Análise cinética das imobilizações realizadas no segundo bloco de reações, avaliando o efeito da quantidade de monômero alimentado.

Na Figura 4.57 também são mostradas as cinéticas de imobilização, mas baseadas na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante. Pode-se observar que o mesmo comportamento obtido para a atividade hidrolítica é também encontrado para a quantidade de proteína. Logo, a diminuição da atividade está associada a uma maior adsorção proteica e não a uma desnaturação da enzima, como mencionado anteriormente.

A influência da quantidade de monômero na atividade de hidrólise dos biocatalisadores produzidos no segundo bloco experimental foi avaliada. Na Figura 4.58 são apresentadas as atividades hidrolíticas das diferentes enzimas imobilizadas produzidas. Pode-se observar que o aumento na quantidade de monômero alimentado provoca uma queda na atividade de hidrólise dos biocatalisadores, apesar do aumento da quantidade de monômero provocar um aumento na área específica dos suportes

sintetizados, como mostrado anteriormente. Dessa forma, é possível imaginar que são mais significativos os efeitos difusionais presentes, provocando a queda da atividade hidrolítica da enzima imobilizada.

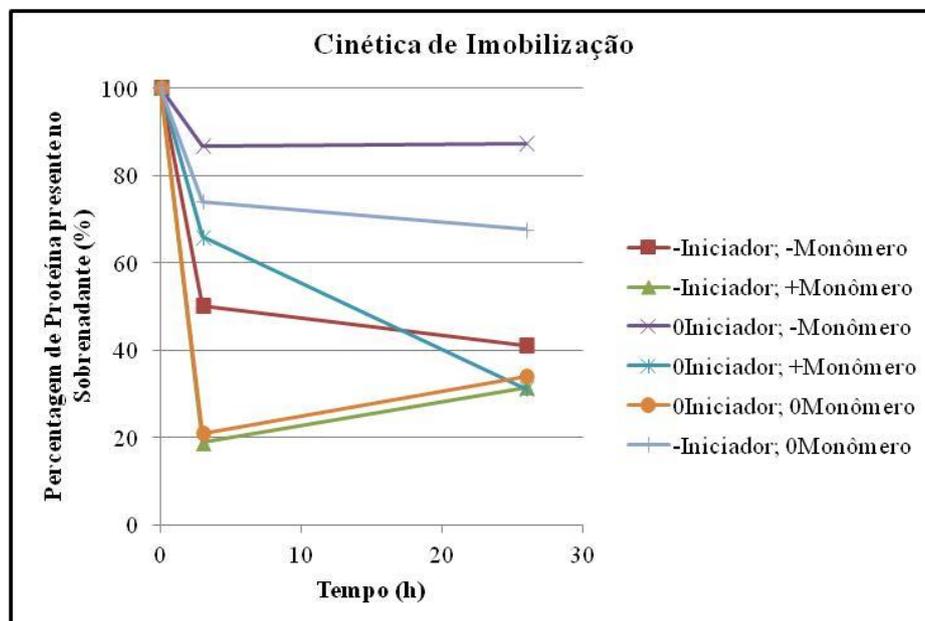


Figura 4.57. Análise cinética das imobilizações realizadas, no segundo bloco de reações, baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante.

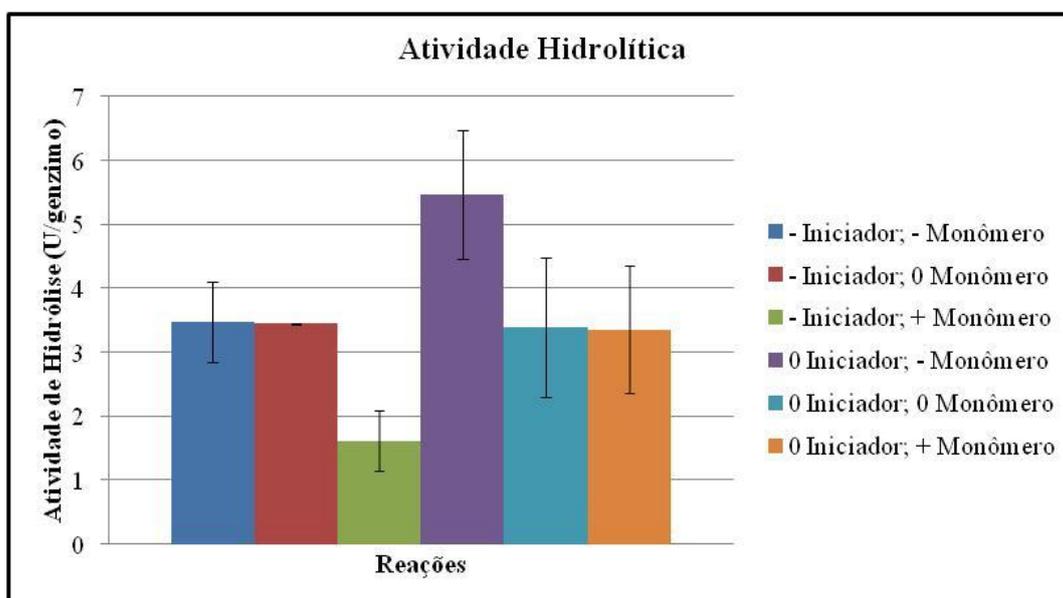


Figura 4.58. Efeito da quantidade de monômero alimentada na atividade de hidrólise da enzima imobilizada.

Na Figura 4.59 é mostrado o efeito da quantidade de monômero alimentado na atividade de esterificação da enzima imobilizada. Nota-se que para cada bloco de reações (com menos e com mais iniciador), o aumento na quantidade de monômero alimentado provoca um aumento na atividade de esterificação. Apenas a reação 13 (- Iniciador; - Monômero) apresenta um comportamento distinto das demais. Esse aumento pode ser resultado de uma maior quantidade de proteína retida nos suportes, como consequência da maior área apresentada pelos mesmos.

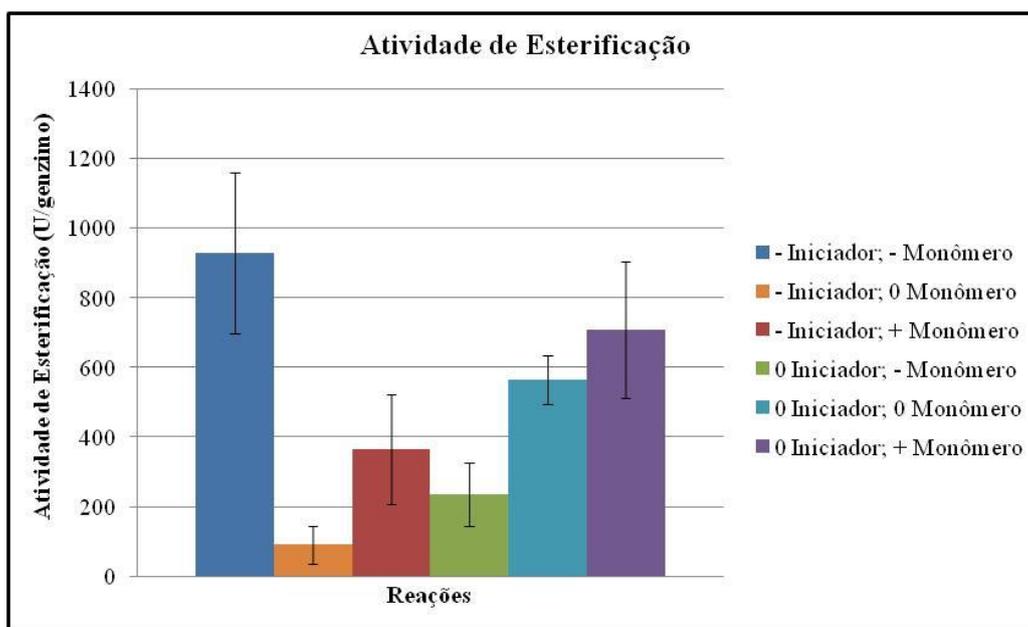


Figura 4.59. Efeito da quantidade de monômero alimentada na atividade de esterificação da enzima imobilizada.

Assim, foi possível determinar os parâmetros de imobilização para os diferentes biocatalisadores produzidos neste segundo bloco experimental. Na Tabela 4.17 são mostrados os resultados obtidos. Como cada imobilização foi realizada a partir de soluções enzimáticas preparadas em momentos diferentes, cada carga inicial apresenta um desvio distinto.

Tabela 4.17. Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações do segundo bloco.

Suportes	Legenda	Uc (U/gsuporte)	Uimo Hidrolítica (U/genzimo)	Uimo Esterificação (U/genzimo)	Uteo (U/gsuporte)	Rendimento de Imobilização (%)	Retenção de Atividade Hidrólise (%)	Conc. de Ptn retida no suporte (mg/gsuporte)
Reação_13	-Iniciador; -Monômero	76,0	3,5±0,6	929±231	70,2	92,5	4,9	2,12
Reação_14	-Iniciador; +Monômero	80,6	1,6±0,5	364±156	73,3	90,9	2,2	2,40
Reação_15	0Iniciador; -Monômero	81,4	4,5±1,0	234±90	17,6	21,6	25,7	0,45
Reação_16	0Iniciador; +Monômero	81,6	4,4±1,0	512±197	64,2	78,6	6,8	2,44
Reação_17	0Iniciador; 0Monômero	112,0	3,4±1,1	565±71	97,9	87,4	3,5	2,71
Reação_18	-Iniciador; 0Monômero	111,5	3,0±0,01	90±55	37,4	33,5	7,9	1,33

De forma a facilitar a compreensão das relações existentes entre as propriedades morfológicas dos suportes produzidos e os parâmetros de imobilização obtidos, diversas figuras foram elaboradas e são mostradas a seguir. Na Figura 4.60 é possível observar a influência da área específica dos suportes sintetizados nos parâmetros de imobilização. Os resultados obtidos corroboram as conclusões encontradas no primeiro bloco de reações: há uma área específica mínima necessária para que toda a carga proteica inicial seja adsorvida e o aumento da área específica é acompanhado pela redução da retenção de atividade. Quanto maior é a área específica, mais pronunciados são os efeitos difusionais, resultando em menores retenções de atividade.

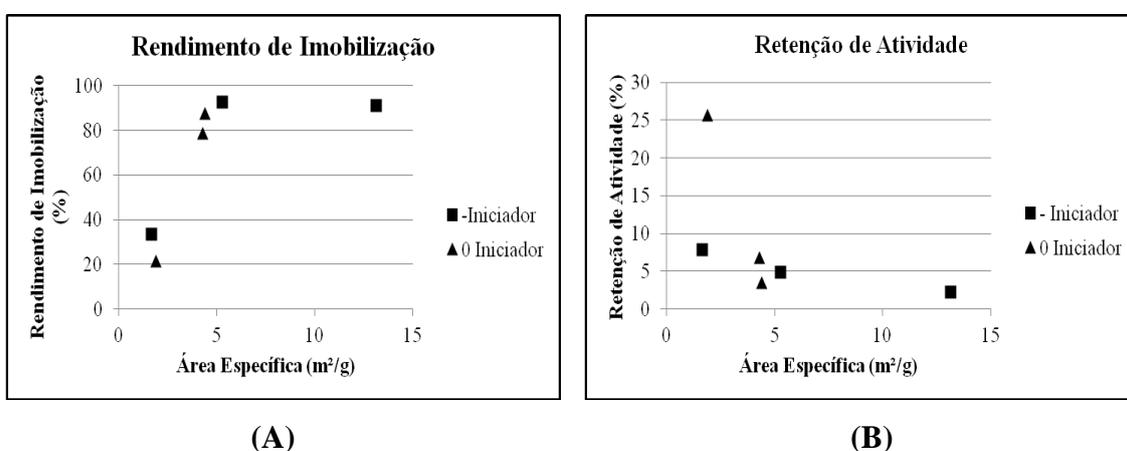


Figura 4.60. Efeito da área específica dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: **(A)** rendimento de imobilização, **(B)** retenção de atividade.

O efeito da área específica dos suportes sobre a atividade hidrolítica dos biocatalisadores sintetizados é apresentado na Figura 4.61. Percebe-se que o aumento da área é acompanhado pela diminuição da atividade de hidrólise, muito provavelmente em função das limitações difusionais intrínsecas a esse tipo de ensaio.

Na Figura 4.62 são apresentados os efeitos do volume específico de poros sobre os parâmetros de imobilização. Notam-se comportamentos similares aos observados para a área específica. Esses resultados eram esperados, uma vez que, como mostrado anteriormente, o volume específico de poros e a área específica dos suportes aparentam ser linearmente dependentes.

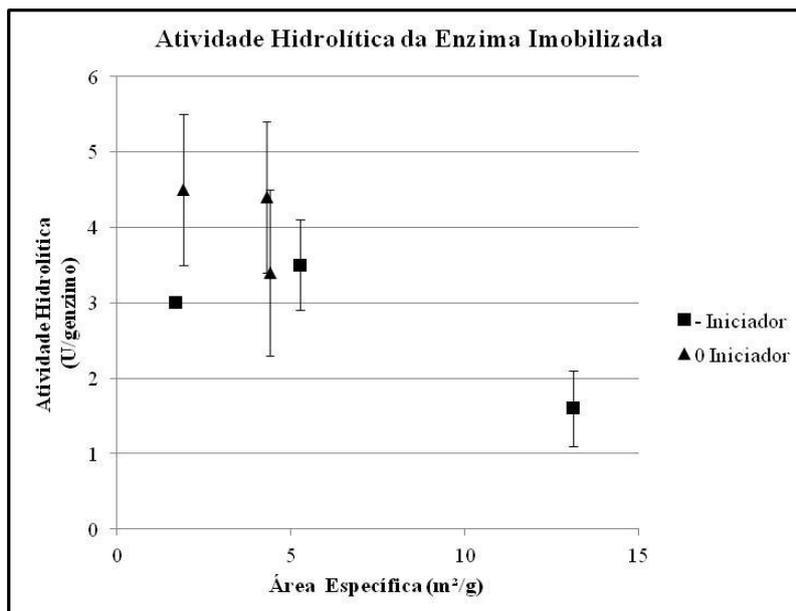


Figura 4.61. Efeito da área específica dos suportes na atividade de hidrólise das enzimas imobilizadas no segundo bloco de experimentos.

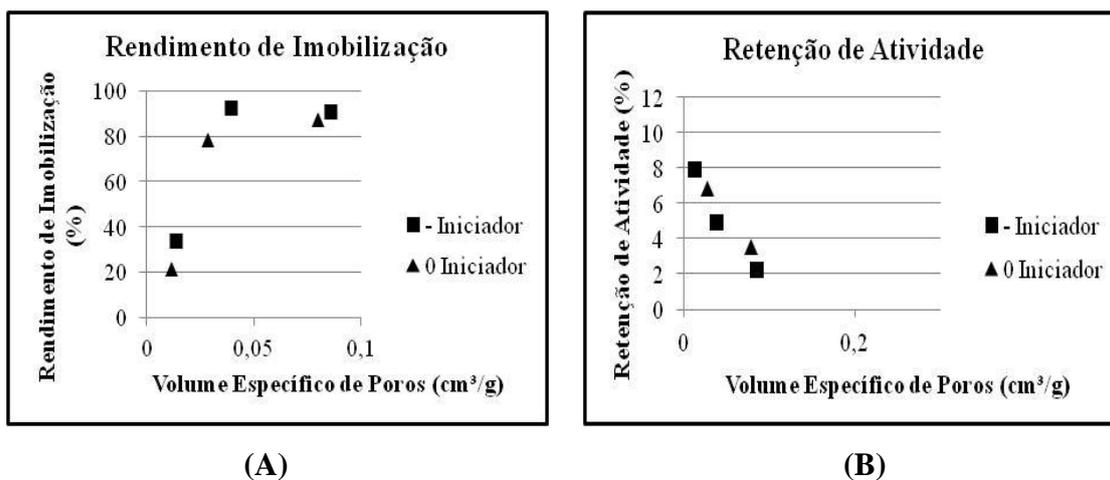


Figura 4.62. Efeito do volume específico de poros dos suportes sobre os parâmetros de imobilização no segundo bloco de experimentos: **(A)** rendimento de imobilização, **(B)** retenção de atividade.

A influência do volume específico de poros na atividade de hidrólise da enzima imobilizada é mostrada na Figura 4.63. Aparentemente, o volume específico de poros provoca uma diminuição sutil na atividade hidrolítica da enzima imobilizada.

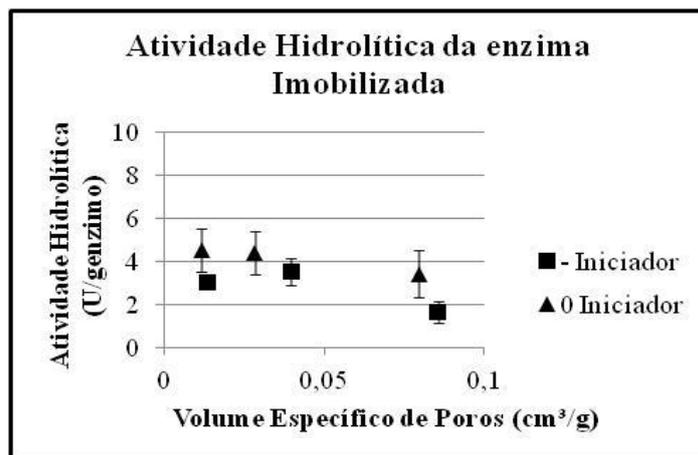


Figura 4.63. Efeito do volume específico de poros dos suportes na atividade de hidrólise da enzima imobilizada.

A influência do diâmetro médio de poro sobre os parâmetros de imobilização também foi avaliada e é apresentada na Figura 4.64. Nota-se que aparentemente, o diâmetro de poro não interfere no rendimento de imobilização, como mostrado no primeiro bloco experimental. No entanto, duas reações apresentam comportamentos bastante distintos das demais, provavelmente em função da interferência de outras variáveis que não estão sendo aqui consideradas. Ao observar a retenção de atividade novamente não é evidenciado um efeito do diâmetro de poro sobre este parâmetro, com exceção da reação 15 que apresenta comportamento distinto das demais, muito provavelmente em função da pequena área específica que a partícula possui.

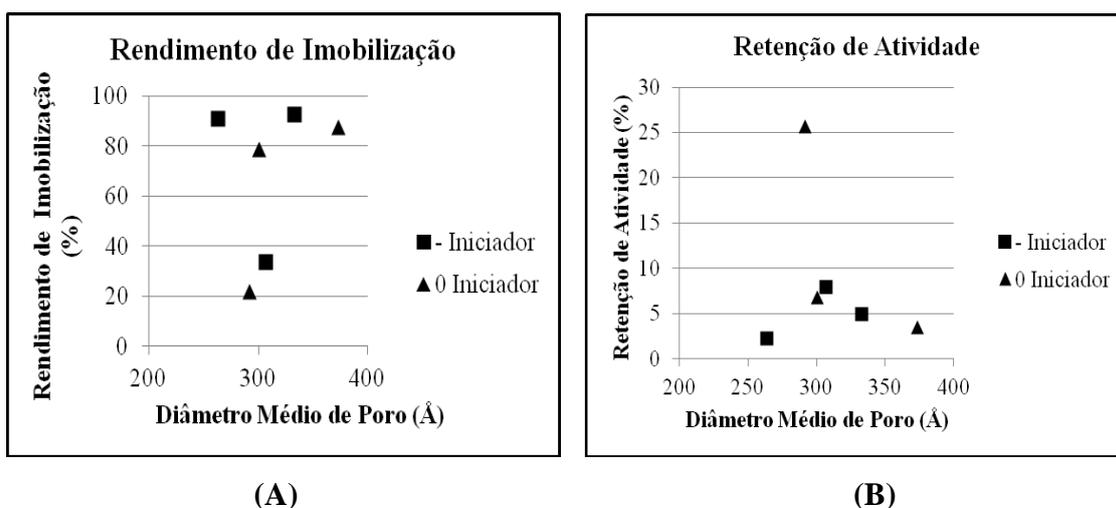


Figura 4.64. Efeito do diâmetro médio de poro dos suportes sobre os parâmetros de imobilização: **(A)** rendimento de imobilização, **(B)** retenção de atividade.

A maneira como o diâmetro médio de poro afeta a atividade de hidrólise da enzima imobilizada é mostrada na Figura 4.65. Como observado também a partir do primeiro bloco experimental, aparentemente o diâmetro médio de poro não afeta a atividade de hidrólise do biocatalisador.

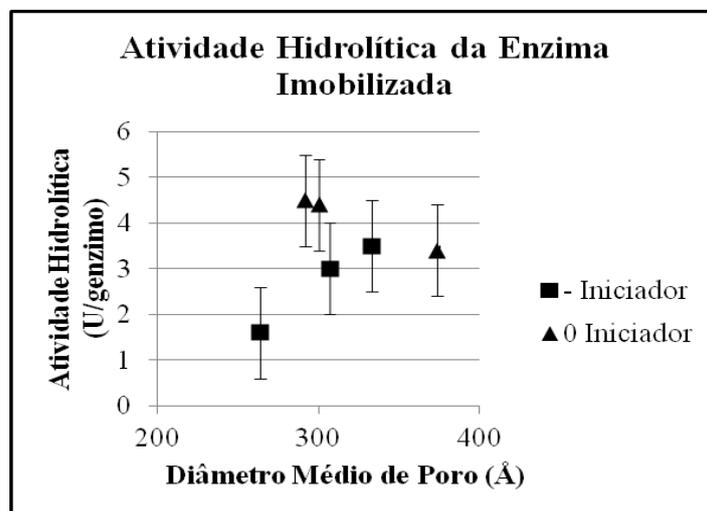


Figura 4.65. Influência do diâmetro médio de poro na atividade hidrolítica do biocatalisador.

Os efeitos das propriedades morfológicas dos suportes nas atividades de esterificação das enzimas imobilizadas são apresentados na Figura 4.66. Percebe-se que há uma tendência de aumento da atividade de esterificação com o aumento da área específica, muito provavelmente em função da maior quantidade de proteína retida ao suporte. Apenas a reação 13 apresenta uma atividade muito elevada em relação às demais. O aumento do volume específico de poros também é acompanhado pelo aumento da atividade de esterificação. Esses resultados são similares aos obtidos para o primeiro bloco experimental.

No entanto, observa-se que, aparentemente, o diâmetro médio de poro não afeta a atividade de esterificação dos biocatalisadores. Esse comportamento difere do encontrado a partir do primeiro bloco de reações, quando foi observada uma queda de atividade com o aumento do diâmetro. Isso pode ser consequência da presença de inúmeros fatores envolvidos no sistema, que não estão sendo considerados, como possíveis efeitos conformacionais ou estereoquímicos. Esses efeitos estão presentes nos

processos de imobilização e podem provocar alterações em comportamentos esperados. Além disso, é necessário avaliar as diferentes variáveis apresentadas em conjunto.

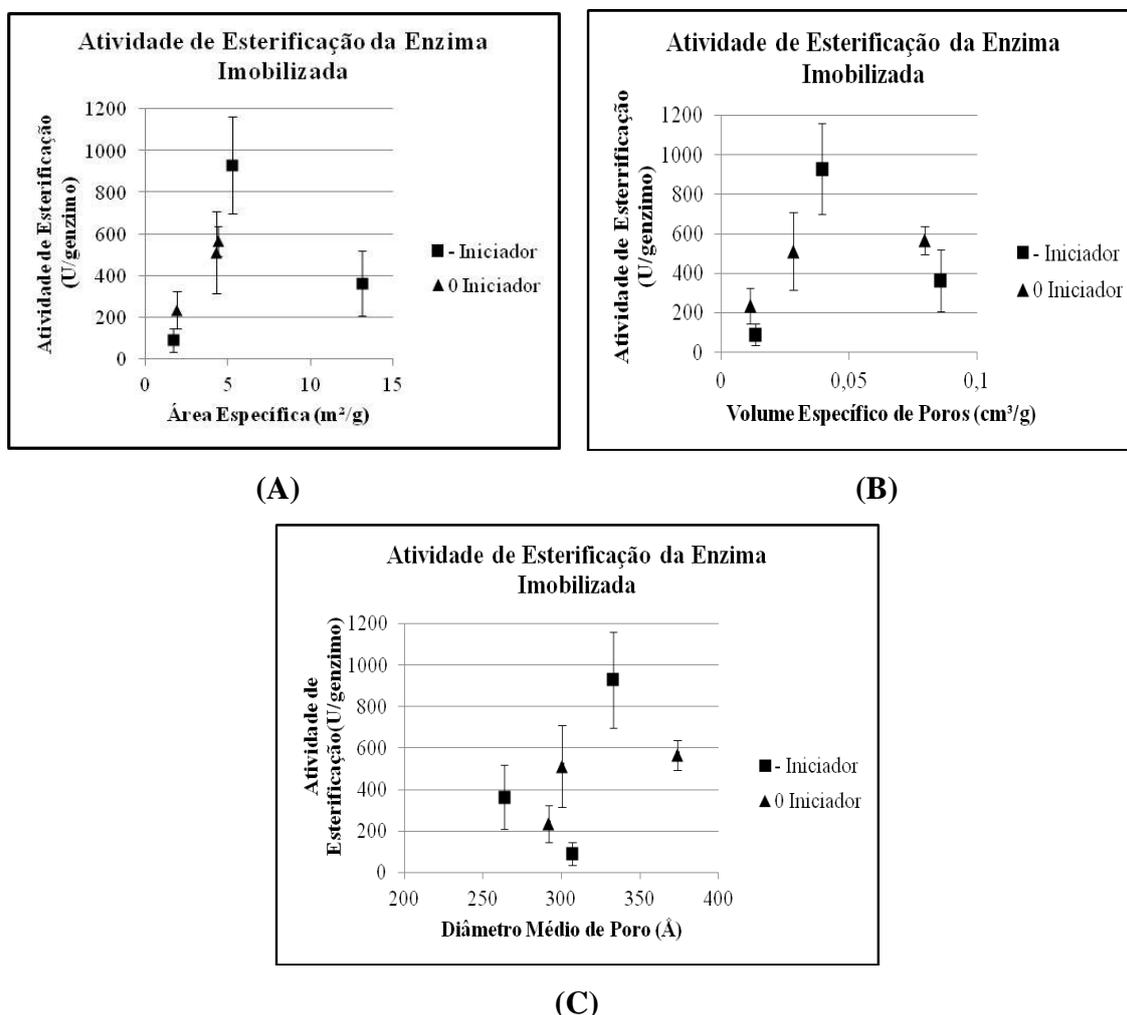


Figura 4.66. Efeito das propriedades morfológicas dos suportes nas atividades de esterificação das enzimas imobilizadas: **(A)** área específica, **(B)** volume específico de poros, **(C)** diâmetro médio de poro.

4.2.3. Validação dos Modelos Propostos

A partir dos resultados obtidos com o segundo bloco de experimentos, pôde-se validar os modelos desenvolvidos na primeira etapa do trabalho. Dessa forma, empregaram-se os modelos elaborados a partir do primeiro bloco experimental no cálculo das atividades de hidrólise e de esterificação dos suportes produzidos na segunda etapa do trabalho, considerando suas propriedades morfológicas.

Nas Figuras 4.67 e 4.68 são mostrados os valores de atividade obtidos a partir dos modelos e os valores encontrados experimentalmente. É possível perceber que os modelos desenvolvidos previamente não são capazes de descrever de forma satisfatória as atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores desenvolvidos no segundo bloco experimental. Isso mostra que a variação das quantidades alimentadas de monômero introduziu novos efeitos no complexo sistema reacional estudado. Dessa forma, novos modelos foram propostos, com o objetivo de descrever de forma mais eficiente as atividades dos biocatalisadores sintetizados ao longo de todo o trabalho.

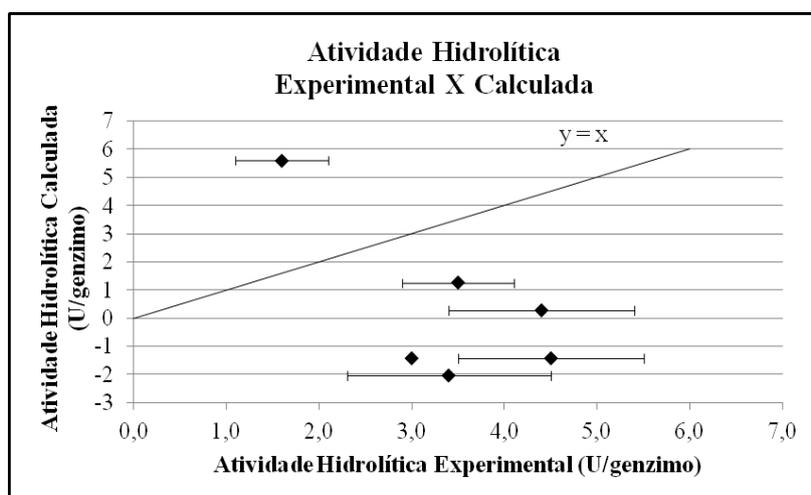


Figura 4.67. Comparação entre as atividades hidrolíticas experimentais e as previstas pelo modelo considerando o segundo bloco de experimentos.

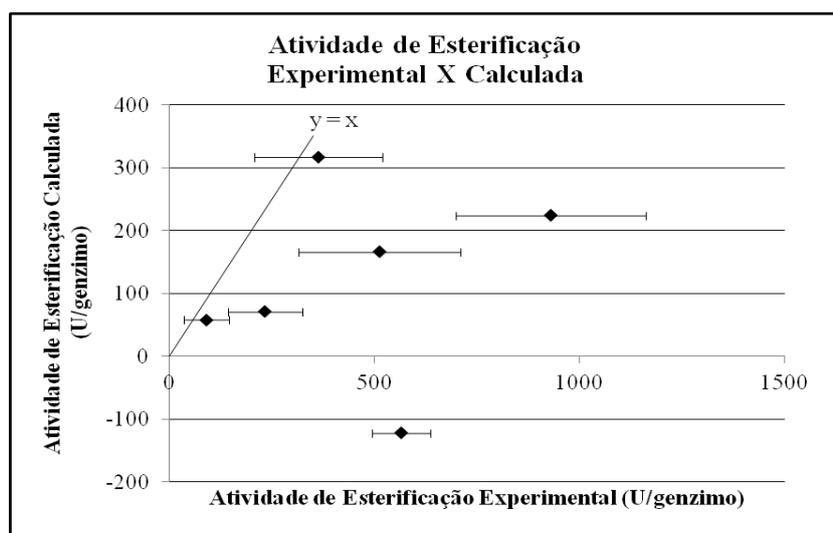


Figura 4.68. Comparação entre as atividades de esterificação experimentais e as previstas pelo modelo considerando o segundo bloco de experimentos.

Nas Tabelas 4.18 e 4.19 são apresentados os novos modelos empíricos desenvolvidos, englobando todos os dados de atividade de hidrólise e de esterificação obtidos a partir dos dois blocos de experimentos do trabalho (apenas os resultados obtidos a partir das reações 12 e 13 foram desconsiderados nesta elaboração, em função da discrepância observada em relação aos demais resultados encontrados). Nas análises realizadas nas seções anteriores, foi possível avaliar o efeito de cada variável envolvida no sistema de forma individualizada. Por meio da modelagem é possível identificar os diferentes fatores que influem sobre um dado sistema (no caso deste trabalho, sobre as atividades de de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores), avaliando inclusive o efeito sinérgico que pode existir entre eles.

É possível perceber que o modelo elaborado para a atividade de hidrólise, apresentado na Tabela 4.18, descreve de forma satisfatória os dados experimentais, apresentando coeficiente de correlação de 0,93. Percebe-se para este sistema, a existência de um máximo de atividade em função da área específica dos suportes (parâmetro b_{11} negativo). Este comportamento corrobora a ideia de que efeitos difusionais estão presentes no ensaio experimental e que interferem no desempenho apresentado pelos biocatalisadores. Além disso, é importante salientar que, ao longo do processo de imobilização, outros efeitos estão presentes, interferindo na atividade enzimática, como efeitos conformacionais e estereoquímicos, efeitos esses que não estão sendo considerados nos modelos propostos. Os resultados mostram também que os diâmetros de poro afetam pouco as atividades, como observado anteriormente.

Na Figura 4.69 é mostrada a relação existente entre as atividades de hidrólise obtidas experimentalmente e as atividades previstas pelo modelo elaborado. Percebe-se que o modelo descreve de forma satisfatória as atividades de hidrólise a partir das propriedades morfológicas dos suportes.

Tabela 4.18. Modelo empírico que descreve a atividade hidrolítica dos biocatalisadores produzidos.

Equação					
$UimoHidro.= a1*Sesp + a3* Vesp+ b11*Sesp*Sesp+b12*Vesp*Dp +b13*Sesp*Dp$					
Parâmetros Estimados (R=0,93; Grau de Liberdade=6)					
Parâmetros	a1 (U.m ⁻²)	a3 (10 ⁶ .U.m ⁻³)	b11 (U.g.m ⁻⁴)	b12 (10 ¹⁶ .U.m ⁻⁴)	b13 (10 ¹⁰ .U.m ⁻³)
Valores Estimados	11,43	-889,61	-0,17	2,51	-0,03
Desvio Padrão	1,79	209,74	0,02	0,57	0,01
p-level	0,000	0,003	0,000	0,002	0,000

sendo: UimoHidro, a atividade de hidrólise da enzima imobilizada (U/g); Sesp, a área específica das partículas do suporte (m²/g); Dp, o diâmetro médio de poro (Å); Vesp, o volume específico de poros (cm³/g).

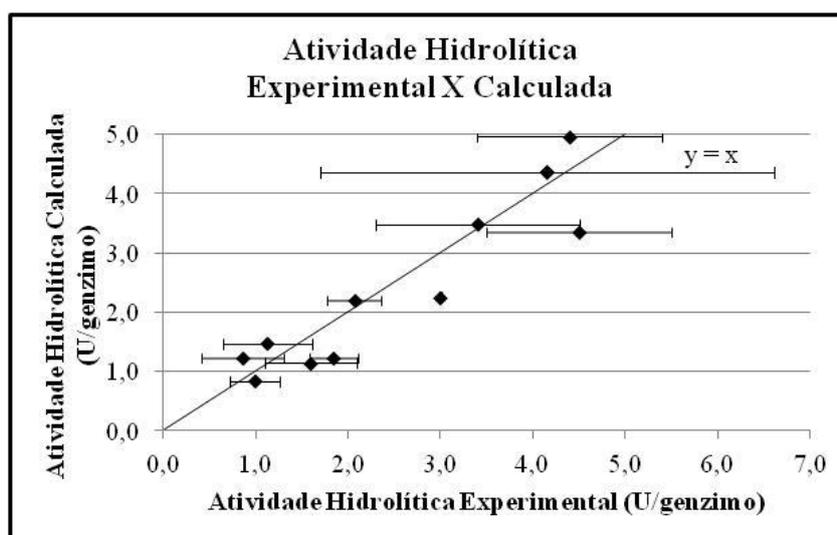


Figura 4.69. Relação entre as variáveis observadas e as previstas pelo modelo, considerando a atividade hidrolítica.

O modelo elaborado para a atividade de esterificação, mostrado na Tabela 4.19, não foi tão satisfatório quanto o obtido para a atividade de hidrólise, apesar do maior número de parâmetros utilizados no seu desenvolvimento.

Tabela 4.19. Modelo empírico que descreve a atividade de esterificação dos biocatalisadores produzidos.

Equação								
UimoEster.= a0+a1*Sesp + a2* Dp + a3*Vesp+b11*Sesp* Dp+b12*Vesp*Sesp+b13*Vesp*Dp+c12*Sesp*Dp*Vesp								
Parâmetros Estimados (R=0,86; Grau de Liberdade=3)								
Parâmetros	a0 (U.g ⁻¹)	a1 (U.m ⁻²)	a2 (10 ¹⁰ .U.(g.m) ⁻¹)	a3 (10 ⁶ .U.m ⁻³)	b11 (10 ¹⁰ .U.m ⁻³)	b12 (10 ⁶ .U.g.m ⁻⁵)	b13 (10 ¹⁶ .U.m ⁻⁴)	c12 (10 ¹⁶ .U.g.m ⁻⁶)
Valores Estimados	1035,53	69,74	-3,32	-41186,27	-0,02	4874,87	163,64	-21,45
Desvio Padrão	852,11	372,36	2,70	52778,41	1,11	4215,15	150,17	14,50
p-level	0,28	0,86	0,27	0,47	0,99	0,30	0,33	0,20

sendo: UimoEster, a atividade de esterificação da enzima imobilizada (U/g); Sesp, a área específica das partículas do suporte (m²/g); Dp, o diâmetro médio de poro (Å); Vesp, o volume específico de poros (cm³/g).

A dificuldade encontrada para descrever as atividades de esterificação pode ser originada dos erros experimentais envolvidos e principalmente do efeito causado por outras variáveis envolvidas no sistema e que não são consideradas no modelo apresentado. Nestas reações de esterificação são mais intensos os efeitos de partição, uma vez que um dos substratos envolvidos apresenta cadeia carbônica longa, assim como o produto formado, oleato de etila. Além disso, também estão presentes os efeitos difusionais. A presença desses efeitos dificulta a elaboração de um modelo capaz de descrever a atividade de esterificação de forma mais satisfatória.

A relação existente entre as atividades de esterificação encontradas experimentalmente e as previstas pelo modelo é mostrada na Figura 4.70. Pode-se perceber que o modelo desenvolvido, considerando os erros experimentais envolvidos no processo, descrevem de forma satisfatória os dados experimentais. No modelo proposto, o efeito dominante é o da área específica, que provoca aumento das atividades de esterificação.

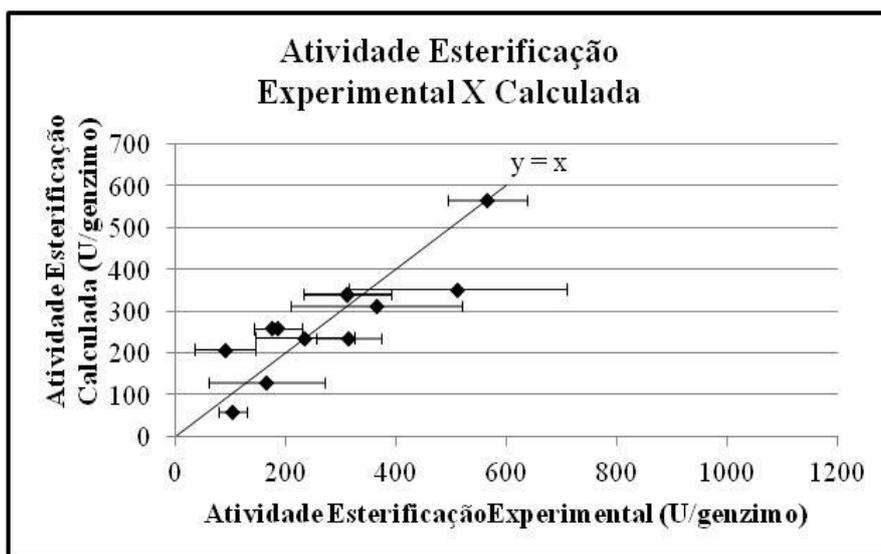


Figura 4.70. Relação entre as variáveis observadas e as previstas pelo modelo, considerando a atividade de esterificação.

Outros dois modelos foram elaborados com o objetivo de descrever as atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores a partir das variáveis operacionais empregas na etapa de polimerização. Dessa forma, por meio dos modelos desenvolvidos e das atividades desejadas para o bicatalisador, seria possível a obtenção de informações sobre a forma mais adequada de operar o sistem de síntese do suporte polimérico. Os

modelos são apresentados nas Tabelas 4.20 e 4.21. Vale ressaltar que para partir de um conjunto consistente de dados novamente as reações 12 e 13 foram desconsideradas.

O modelo desenvolvido para atividade hidrolítica em função das variáveis operacionais, mostrado na Tabela 4.20, é novamente satisfatório ($R=0,95$). No entanto, para representar o sistema é necessário um grande número de parâmetros. Observa-se também que a quantidade de monômero alimentada não interfere na atividade de hidrólise dos biocatalisadores, não sendo uma variável necessária na modelagem do sistema. Percebe-se também que em função do maior número de parâmetros envolvidos, uma análise sobre o efeito de cada uma das variáveis na atividade de hidrólise do biocatalisador é dificultada.

Contudo, o modelo desenvolvido para atividade de esterificação, apresentado na Tabela 4.21, não foi eficiente. Mesmo com o emprego de inúmeros parâmetros, não é possível descrever o sistema de esterificação de forma satisfatória. Dessa forma, percebe-se que o desempenho do biocatalisador não é explicado apenas pelas propriedades morfológicas dos suportes e pelas variáveis operacionais. É possível notar que os outros fatores envolvidos no sistema, como os efeitos de partição e os efeitos difusionais, podem interferir no desempenho dos biocatalisadores. Além disso, a própria polaridade na superfície dos suportes pode ser afetada pela quantidade de iniciador e de emulsificante empregada nas reações de polimerização, o que pode tornar a modelagem deste sistema ainda mais complexa.

Tabela 4.20. Modelo empírico que descreve a atividade hidrolítica da enzima imobilizada a partir das variáveis operacionais.

Equação								
$U_{imoHidro} = a_0 + a_1 * V + a_2 * ME + a_3 * MI + b_1 * V * ME + b_2 * V * MI + b_3 * ME * MI + c_1 * V * ME * MI$								
Parâmetros Estimados (R=0,95; Grau de Liberdade=3)								
Parâmetros	a0 (U.g ⁻¹)	a1 ((U.h).(g.l) ⁻¹)	a2 (U.g ⁻²)	a3 (U.g ⁻²)	b1 ((U.h).(g ² .l) ⁻¹)	b2 ((U.h).(g ² .l) ⁻¹)	b3 (U.g ⁻³)	c1 ((U.h).(g ³ .l) ⁻¹)
Valores Estimados	-100492	2955805	40092	334152	-1179327	-9829143	-133305	3921611
Desvio Padrão	28372	775576	11316	93803	309374	2567838	37412	1024316
p-level	0,006	0,004	0,006	0,006	0,004	0,004	0,006	0,004

sendo: $U_{imoHidro}$, a atividade de hidrólise da enzima imobilizada (U/g); ME, a massa de emulsificante (g); MI, a massa de iniciador (g); V, a vazão para alimentação do monômero (l/h).

Tabela 4.21. Modelo empírico que descreve a atividade de esterificação da enzima imobilizada a partir das variáveis operacionais.

Equação									
$U_{imoEster} = a_0 + a_1 * V + a_2 * ME + a_3 * MI + b_1 * V * ME + b_2 * V * MI + b_3 * ME * MI + c_1 * V * ME * MI + c_2 * V * ME * M_{mon}$									
Parâmetros Estimados									
(R=0,73; Grau de Liberdade=2)									
Parâmetros	a0 (U.g ⁻¹)	a1 ((U.h).(g.l) ⁻¹)	a2 (U.g ⁻²)	a3 (U.g ⁻²)	b1 ((U.h).(g ² .l) ⁻¹)	b2 ((U.h).(g ² .l) ⁻¹)	b3 (U.g ⁻³)	c1 ((U.h).(g ³ .l) ⁻¹)	c2 ((U.h).(g ³ .l) ⁻¹)
Valores Estimados	-7579417	241642666	3028650	25412916	-96564175	-809069622	-10154009	323297751	40
Desvio Padrão	7406410	202742291	2954017	24489108	80877062	671343166	9767470	267814012	28
p-level	0,34	0,27	0,34	0,33	0,27	0,26	0,33	0,26	0,20

sendo: $U_{imoEster}$, a atividade de esterificação da enzima imobilizada (U/g); ME, a massa de emulsificante (g); MI, a massa de iniciador (g); V, a vazão para alimentação do monômero (l/h); M_{mon} , a massa de monômero alimentada na etapa de emulsão alimentada (g).

4.3. Proposição de um Modelo Físico

Com base nos resultados apresentados, pode-se afirmar que as características morfológicas das partículas casca-núcleo produzidas são fortemente dependentes das condições operacionais. Embora os diâmetros dos poros variem pouco com a modificação das condições de operação, indicando que essa variável depende pouco da morfologia das partículas emulsificadas formadas, a área específica e o volume de poros estão fortemente correlacionados à quantidade relativa de polímero na casca, indicando que o controle adequado do processo de deposição de partículas sobre o núcleo é de fundamental importância. As taxas de aglomeração aumentam com o aumento da quantidade de monômero alimentada e variam de forma não linear com as demais variáveis investigadas, levando ao aparecimento de pontos ótimos de operação. Quando a alimentação de monômero é muito lenta, as taxas de polimerização são muito baixas na emulsão, resultando em uma menor quantidade de partículas emulsificadas que apresentam maior estabilidade. Dessa forma, prejudica-se a formação da casca e o acúmulo de área. Além disso, todos os dados obtidos parecem confirmar a forte interação entre os materiais que constituem as partículas casca-núcleo e o látex no sobrenadante, o que sugere que o látex pode ser formado por partículas que se desprendem da casca polimérica no campo de cisalhamento do reator.

Com relação às reações enzimáticas, parece que a área específica exerce o papel mais importante. De forma geral, quanto maior a área específica, maior é a quantidade de enzima adsorvida e menor é a retenção de atividade de hidrólise, o que induz ao aparecimento de um ponto ótimo. A redução da retenção de atividade indica a existência de resistências difusionais, de maneira que o desenvolvimento de procedimentos que permitam aumentar a porosidade e o diâmetro de poros deve ser encorajado.

Observa-se também que o aumento da atividade de esterificação acompanha o aumento da área. Provavelmente em função de limitações difusionais menos expressivas.

Capítulo V

Conclusões e Sugestões

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que todas as variáveis operacionais investigadas na etapa da polimerização provocam mudanças significativas nas propriedades morfológicas das partículas sintetizadas. Observou-se a existência de um limite de vazão máxima viável para alimentação do monômero (0,082 – 0,12 l/h), acima do qual se perde o controle do sistema, ocorrendo a formação de grandes aglomerados poliméricos. Observou-se também que as massas de iniciador e de emulsificante afetam a área específica dos suportes de forma não linear, resultando em um valor máximo de área específica quando a concentração intermediária de cada componente é empregada na reação. Observou-se ainda que o aumento na quantidade monômero alimentada aumenta o grau de cobertura das partículas poliméricas, provocando também o aumento da aglomeração das partículas.

Dentre as diferentes reações realizadas, foi sintetizado um suporte com área específica de 35m²/g, similar à do suporte comercial Accurel® MP1000. Dessa forma, percebeu-se que alterando as propriedades operacionais da etapa de polimerização, é possível sintetizar suportes poliméricos com diferentes propriedades morfológicas, próximas inclusive das apresentadas por suportes comerciais.

Os resultados mostraram também que a área específica e o volume de poros dos suportes sintetizados são linearmente dependentes, indicando que aumento da área está associado principalmente à quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo e não à morfologia das mesmas.

Com base nos diferentes parâmetros de imobilização determinados, observou-se que, para uma carga proteica inicial, há uma área mínima necessária para que a mesma seja adsorvida nos suportes. O aumento da área específica dos suportes provoca queda

na atividade hidrolítica dos biocatalisadores produzidos, em função da presença de fenômenos de resistência à transferência de massa. Além disso, a retenção de atividade hidrolítica diminui com a área específica, muito provavelmente em função dessas limitações difusionais envolvidas entre o meio reacional e a enzima imobilizada. O aumento da atividade de esterificação pode ser alcançado com o aumento da área específica, em função da maior quantidade de enzima retida ao suporte e da menor importância das resistências difusionais.

A partir dos experimentos realizados, modelos empíricos foram desenvolvidos com o objetivo de descrever as atividades de hidrólise e de esterificação como função das características morfológicas dos suportes: diâmetro médio de poro, volume específico de poros e área superficial. Foi possível perceber que modelo elaborado para a atividade de hidrólise descreve de forma satisfatória os dados experimentais. Observou-se a existência de um máximo de atividade em função da área específica dos suportes. Este comportamento corrobora a ideia de que os efeitos difusionais, conformacionais e estereoquímicos estão presentes neste tipo de análise e que interferem no desempenho apresentado pelos biocatalisadores. Por outro lado, o modelo elaborado para a atividade de esterificação não foi tão satisfatório, apesar do maior número de parâmetros utilizados no seu desenvolvimento. A dificuldade encontrada para descrever as atividades de esterificação pode ser explicada, principalmente pela existência de outras variáveis relevantes que não foram consideradas no modelo apresentado. Além disso, os erros experimentais expressivos envolvidos neste tipo de análise dificultam a modelagem do sistema.

Foram desenvolvidos também modelos empíricos capazes de descrever as atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores a partir das variáveis operacionais empregadas na etapa de polimerização com o objetivo de tornar possível a determinação das condições ideais para a síntese do suporte que resultará no biocatalisador com melhor desempenho. O modelo desenvolvido para atividade hidrolítica em função das variáveis operacionais foi satisfatório. No entanto, o modelo elaborado para atividade de esterificação não foi eficiente. Percebe-se que, para a atividade de esterificação, o desempenho do biocatalisador não pode ser explicado apenas pelas propriedades morfológicas dos suportes e pelas variáveis operacionais.

Nota-se, assim, que outros fatores envolvidos no sistema, como efeitos de partição, difusionais, estereoquímicos, conformacionais, polaridade na superfície do suporte, interferem no desempenho dos biocatalisadores.

5.1. Sugestões

Para trabalhos futuros, sugere-se a realização de novas polimerizações empregando novos monômeros de cadeia longa (que conferem caráter mais hidrofóbico aos suportes produzidos) sob as condições operacionais ótimas determinadas a partir do presente trabalho. O objetivo é verificar se as conclusões aqui obtidas podem ser estendidas a outros monômeros.

Novos estudos devem ser realizados de forma a explorar o emprego de vazões flutuantes na etapa de emulsão alimentada, uma vez que sob esta condição foi obtido o suporte com a maior área específica. Além disso, novas metodologias envolvidas na etapa de imobilização devem ser estudadas com o objetivo de minimizar os erros experimentais obtidos.

Propõe-se ainda o estudo da estabilidade operacional do biocatalisador, já que o uso comercial do produto só é possível se ele demonstrar estabilidade operacional adequada. Além disso, estudos devem ser realizados objetivando avaliar a estabilidade mecânica dos biocatalisadores produzidos e analisar os reatores mais adequados para o emprego dessas enzimas imobilizadas.

Os possíveis fatores presentes no meio reacional que afetam o desempenho do biocatalisador, como polaridade superficial das partículas poliméricas, devem ser avaliados. Particularmente a polaridade da superfície pode ser muito afetada pela presença de iniciadores e de emulsificantes.

Novas enzimas devem ser empregadas nos processos de imobilização, de forma a avaliar a interação das enzimas com os suportes poliméricos produzidos e analisar a aplicação dessas novas enzimas imobilizadas em outras reações.

Finalmente, estudos devem ser realizados com o objetivo de fazer o escalonamento do processo de polimerização e de uso do biocatalisador na síntese de biodiesel ou fármacos, por exemplo.

Apêndice A

A conversão associada a cada um dos tempos de amostragem de cada uma das reações foi calculada a partir das Equações A.1 a A.5. Com a Equação A.1 foi possível calcular a massa de monômero alimentada entre os intervalos de amostragem.

$$\Delta m_{MonAlim} = (\bar{V} * (t_{amN+1} - t_{amN}) * \rho)$$

Equação A.1. Cálculo da massa de monômero alimentada entre cada tempo de amostragem na etapa de emulsão alimentada.

sendo: t_{amN} , o tempo de amostragem; t_{amN+1} , o tempo de amostragem no instante seguinte a t_{amN} ; $\Delta m_{MonAlim}$, a massa de monômero alimentada na etapa de emulsão alimentada entre os tempos de amostragem; \bar{V} , a vazão média entre os dois tempos de amostragem; ρ é a densidade do estireno na temperatura de 25 °C, 0,9 g.ml⁻¹ (SIGMA-ALDRICH, 2013).

Ao somar as massas alimentadas entre os tempos de amostragem, conseguiu-se determinar a massa de monômero alimentada até o instante analisado, como é mostrado na Equação A.2.

$$m_{MonTotalAlimN+1} = m_{MonAlimN} + \Delta m_{MonAlim}$$

Equação A.2. Cálculo da massa total de monômero alimentada até o intervalo de tempo N+1.

sendo: $m_{MonTotalAlimN+1}$, a massa de monômero total alimentada até a o instante N+1; $m_{MonAlimN}$, a massa de monômero alimentada até o instante N; $\Delta m_{MonAlim}$, a massa de monômero alimentada na etapa de emulsão alimentada entre os tempos de amostragem N e N+1.

Para calcular a conversão em cada instante de tempo, como mostrado na Equação A.5, foi necessário saber a quantidade de cada componente presente no meio reacional. Essa informação pôde, então, ser obtida a partir das Equações A.3 e A.4.

$$m_{TotalN+1} = m_{MonAlimN+1} + m_{MonSusp} + m_{AS} + m_{ISusp} + m_{MonCarga} + m_{IEmuls} + m_{Emulsif} + m_{Bicarb} + m_{Água}$$

Equação A.3. Cálculo da massa total presente no reator até o intervalo de tempo N+1.

sendo: $m_{TotalN+1}$, a massa total de reagente presente no reator no instante N+1; $m_{MonAlimN+1}$, a massa de monômero alimentada até o instante N+1; $m_{MonSusp}$, a massa de monômero adicionada na etapa da suspensão; m_{AS} , massa de agente de suspensão adicionada; m_{ISusp} , a massa de iniciador da etapa de suspensão; $m_{MonCarga}$, a carga inicial de monômero adicionada no início da etapa de emulsão alimentada; m_{IEmuls} , a massa de iniciador da etapa de emulsão; $m_{Emulsif}$, massa de emulsificante; m_{Bicarb} , a massa de bicarbonato adicionada; $m_{Água}$, a massa total de água adicionada, incluindo a quantidade utilizada para preparar as soluções aquosas.

$$\frac{m_x}{m_{TotalN+1}} = \% X$$

Equação A.4. Cálculo de percentagem mássica de cada um dos componentes presentes no meio reacional no tempo N+1.

sendo: m_x , a massa de cada um dos constituintes do meio reacional; X, representando cada um dos componentes do meio reacional, agente de suspensão, iniciador da etapa de suspensão, iniciador da etapa de emulsão, água, emulsificante, bicarbonato.

$$C_{N+1} = \frac{m_{seca} - m_{hid} - (m_{úmida} * \% AS) - (m_{úmida} * \% Bicarb) - (m_{úmida} * \% I_{Emuls}) - (m_{úmida} * \% I_{Susp}) - (m_{úmida} * \% Emulsif)}{(1 - \% I_{Susp} - \% Bicarb - \% AS - \% Água - \% I_{Emuls} - \% Emulsif) * m_{úmida}}$$

Equação A.5. Cálculo da conversão no tempo N+1.

sendo: m_{seca} , a massa seca depois de estabilizada, desconsiderando a massa do copinho, onde as amostras foram pesadas; m_{hid} , a massa de hidroquinona presente na solução aquosa de hidroquinona 1 % (p/p); $m_{úmida}$, a massa da amostra logo depois de retirá-la do reator; C_{N+1} , a conversão em cada instante N+1.

Dessa forma, foi possível calcular a conversão em cada tempo de amostragem e realizar a análise cinética das conversões de monômero em cada uma das reações. Os resultados encontrados para os blocos de reação em que foram alteradas as quantidades de iniciador e de emulsificante são mostrados na Figura A.1.

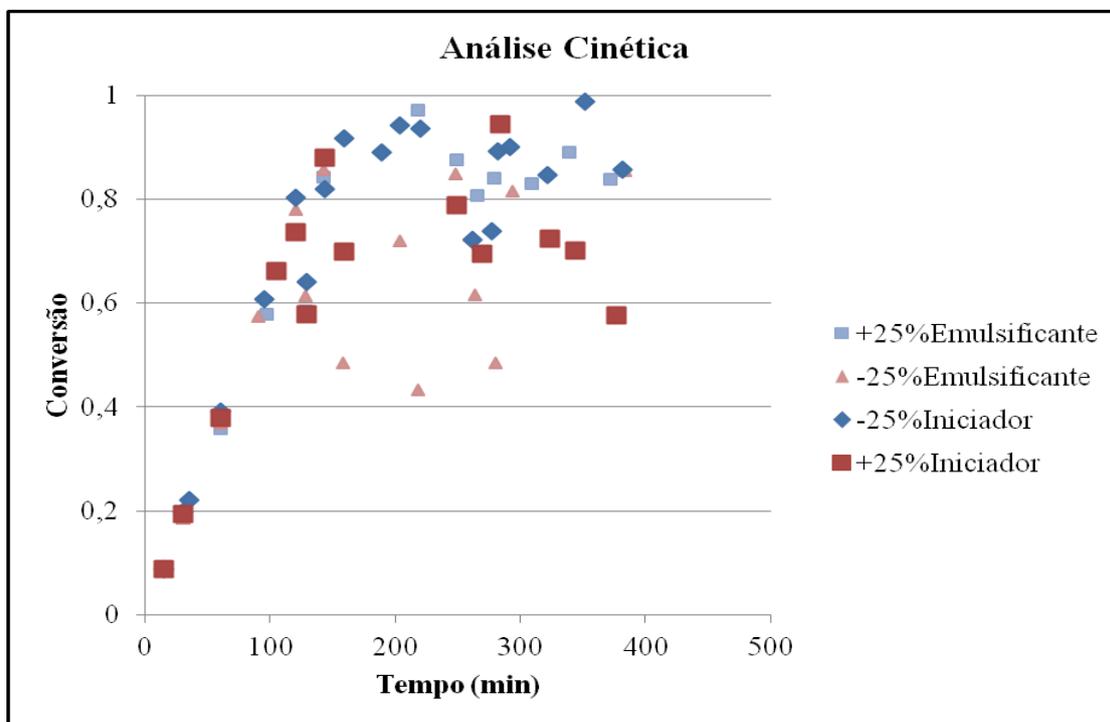


Figura A.1. Análise cinética das conversões de monômero nas reações realizadas, avaliando os efeitos da quantidade de iniciador e da quantidade de emulsificante.

Apêndice B

São apresentados a seguir os termogramas de DSC.

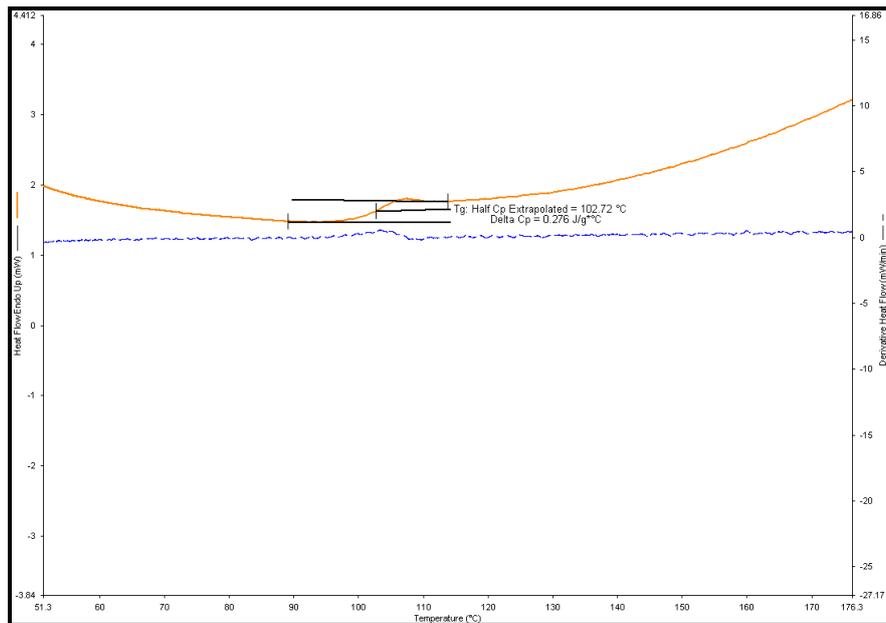


Figura B.1. Curva de DSC da Reação 01.

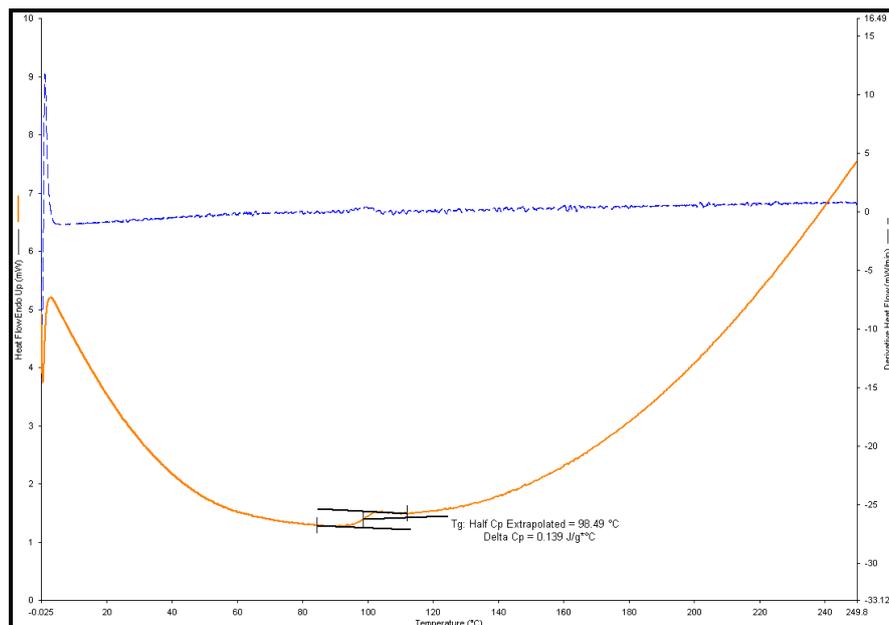


Figura B.2. Curva de DSC da Reação 02.

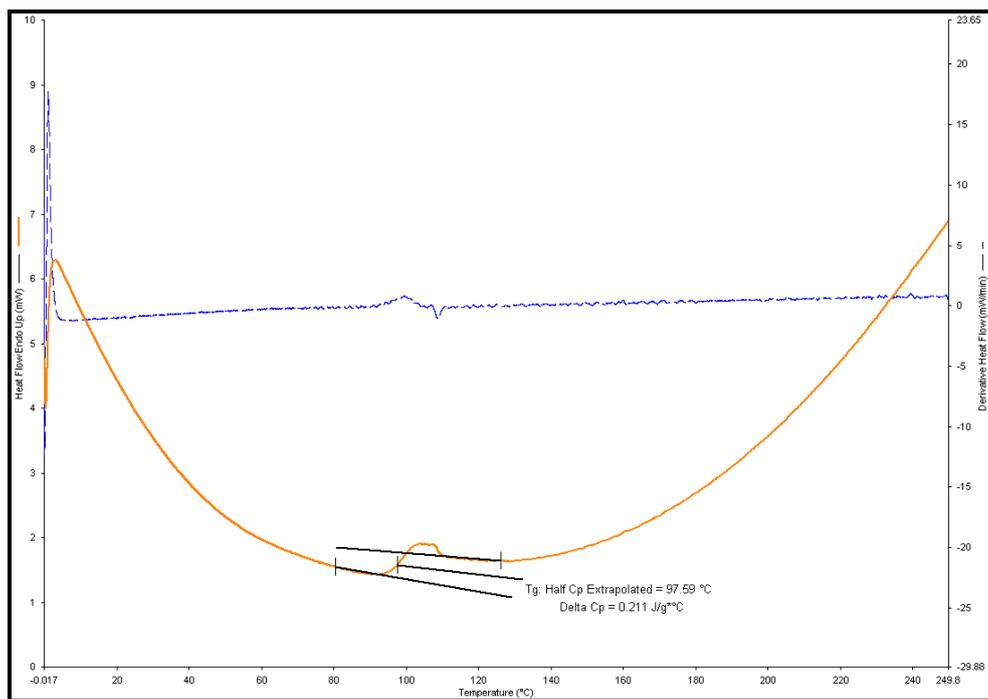


Figura B.3. Curva de DSC da Reação 03.

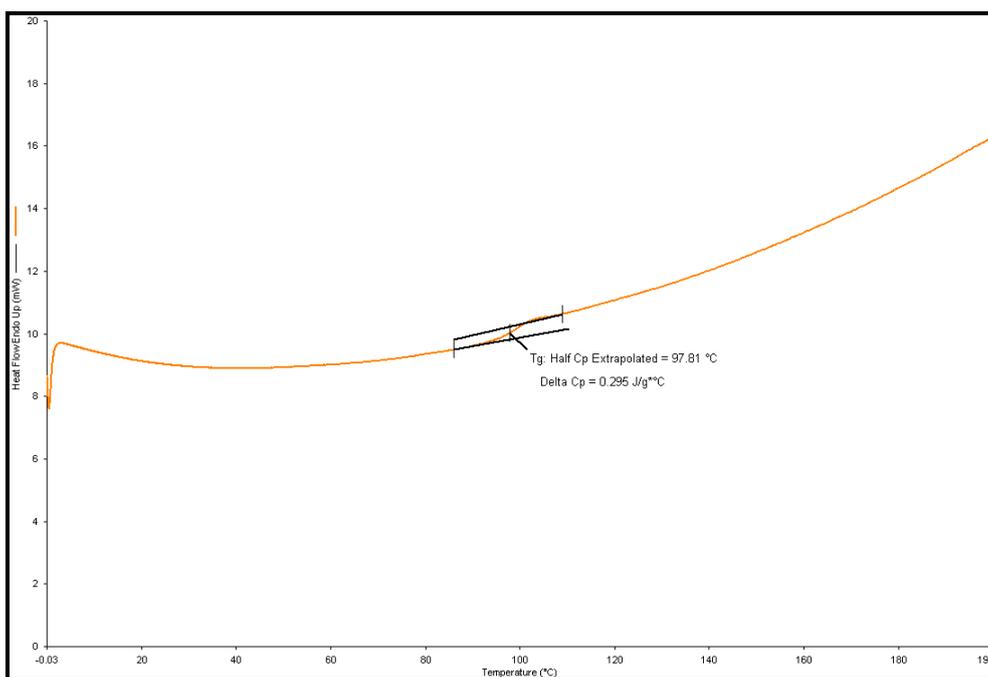


Figura B.4. Curva de DSC da Reação 04.

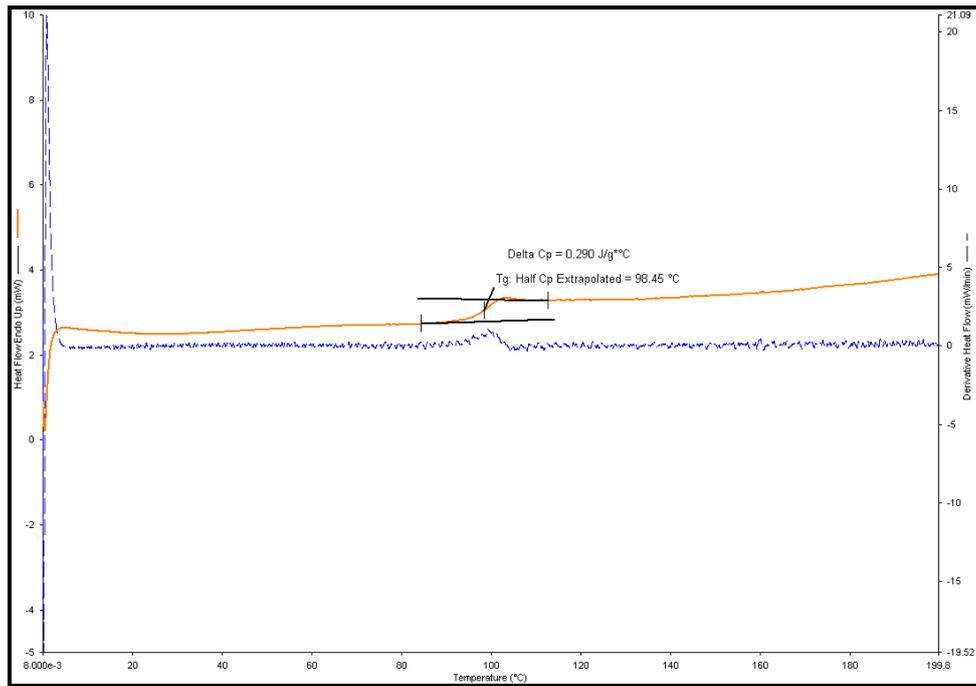


Figura B.5. Curva de DSC da Reação 05.

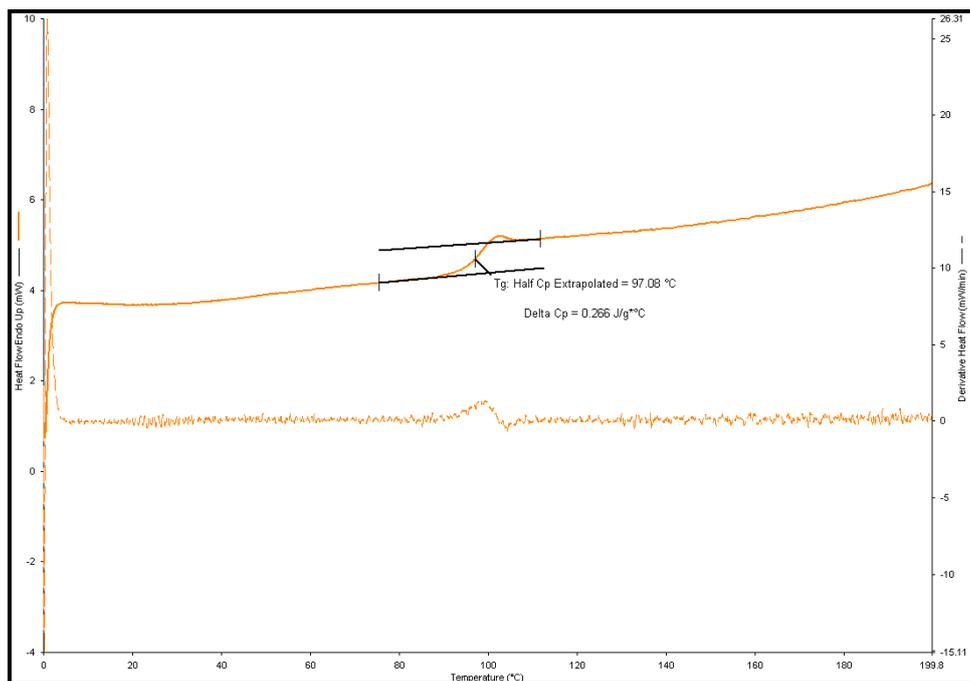


Figura B.6. Curva de DSC da Reação 07.

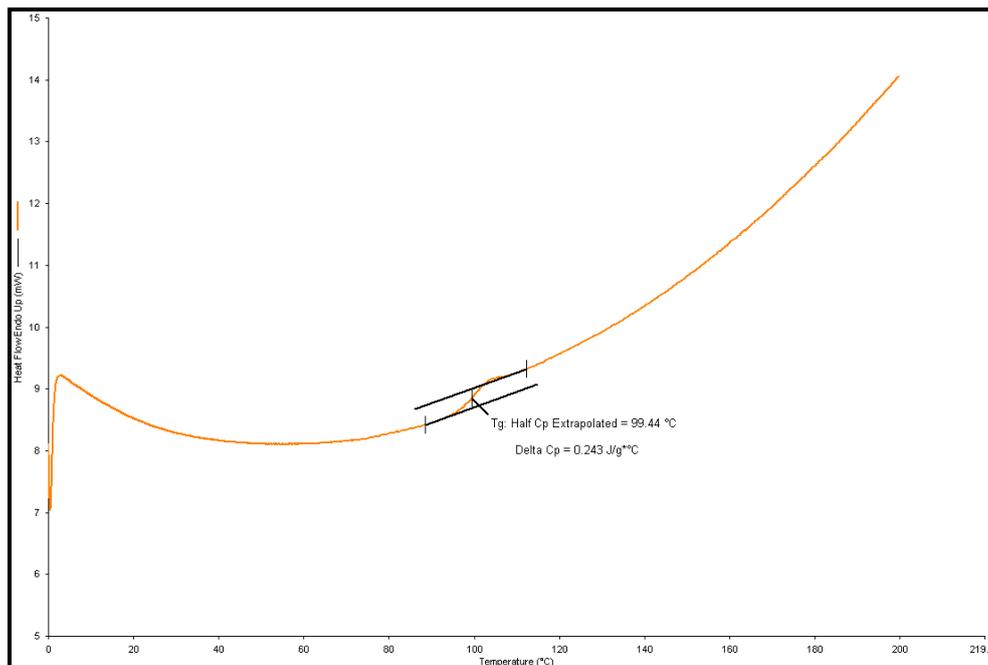


Figura B.7. Curva de DSC da Reação 08.

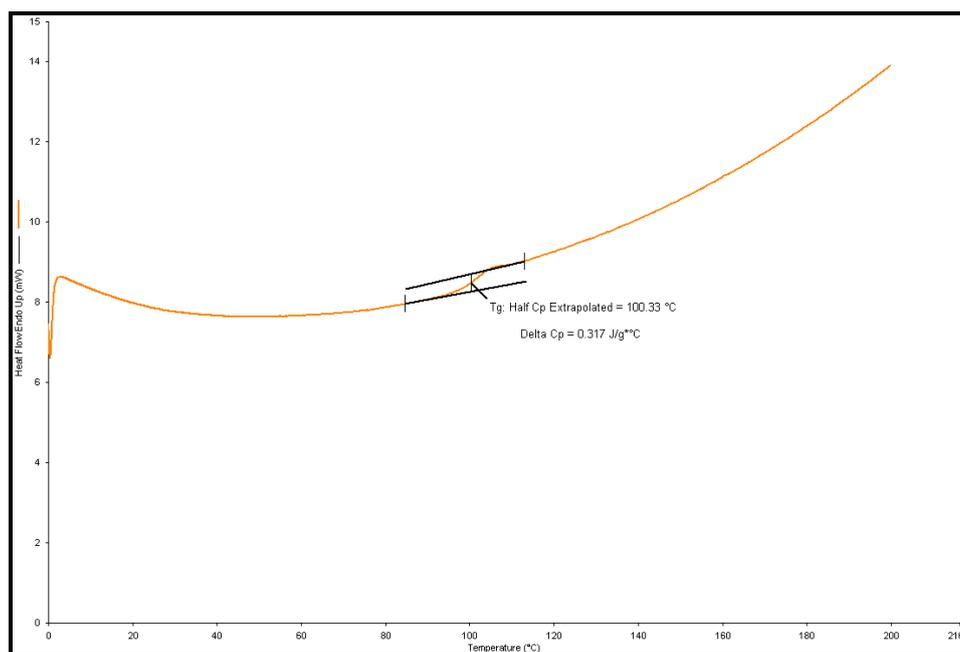


Figura B.8. Curva de DSC da Reação 09.

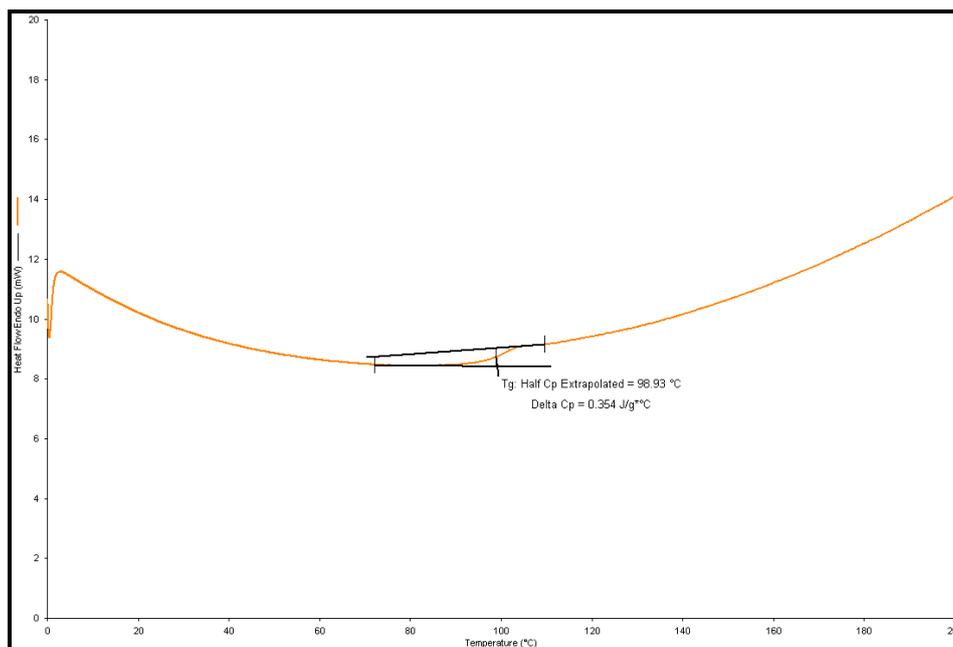


Figura B.9. Curva de DSC da Reação 10.

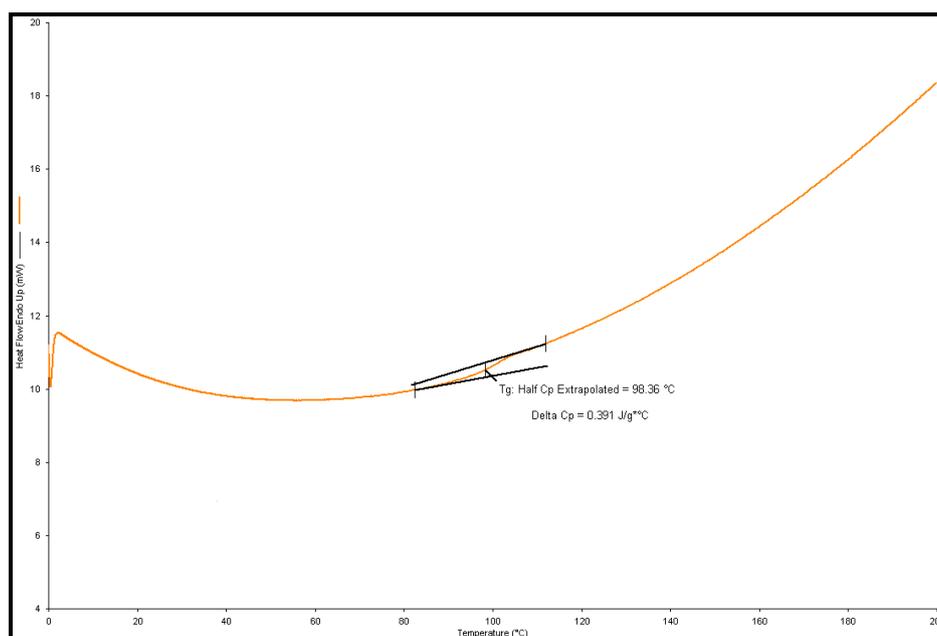


Figura B.10. Curva de DSC da Reação 11.

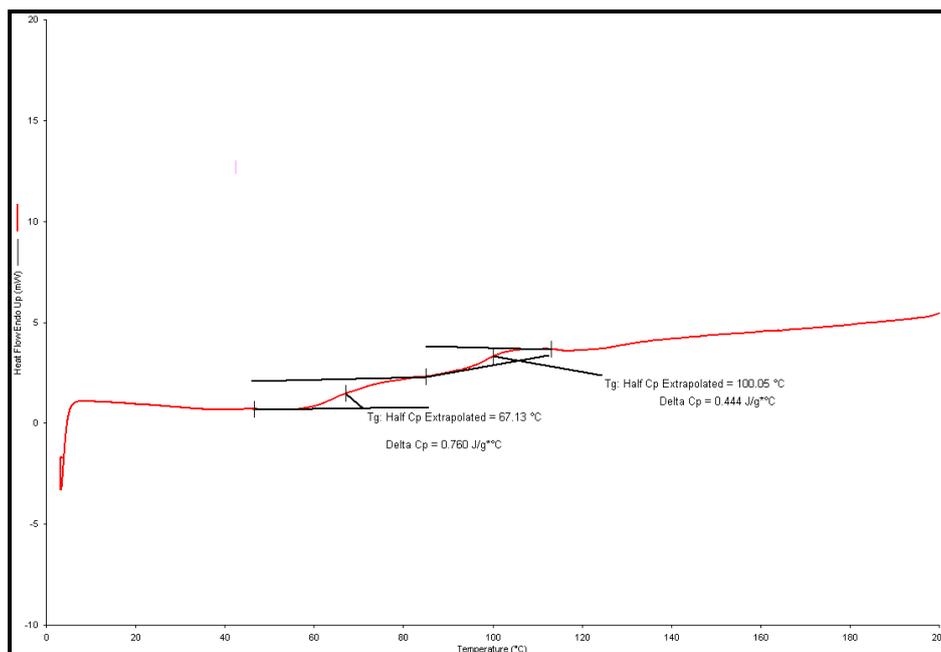


Figura B.11. Curva de DSC da Reação 12.

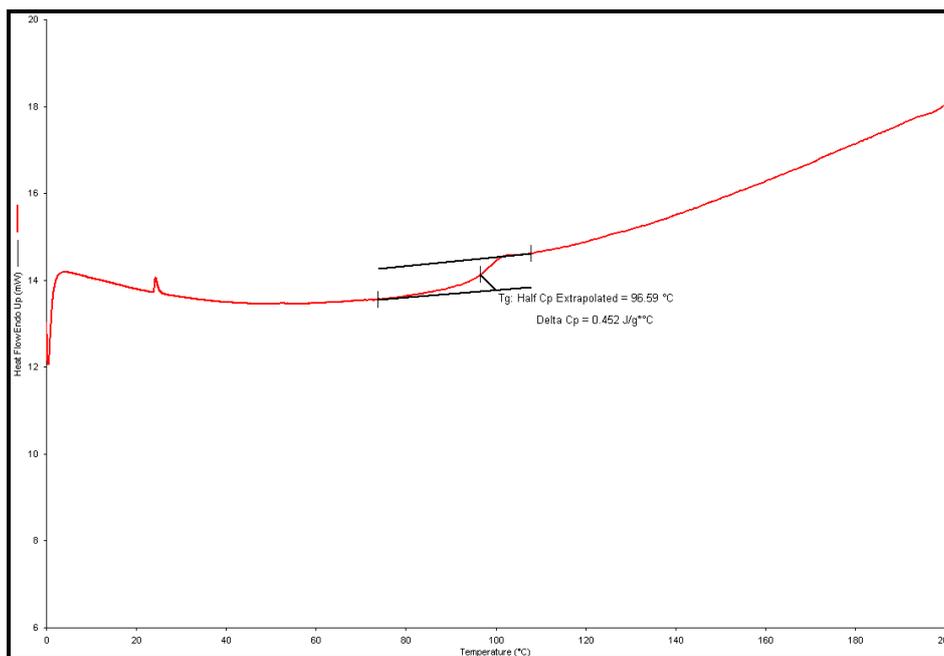


Figura B.12. Curva de DSC da Reação 13.

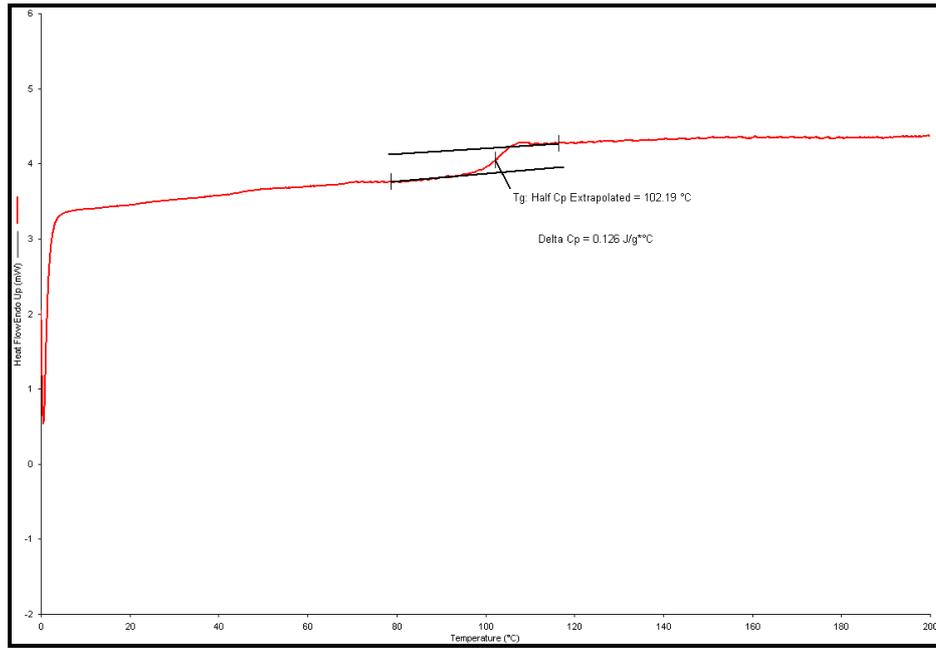


Figura B.13. Curva de DSC da Reação 14.

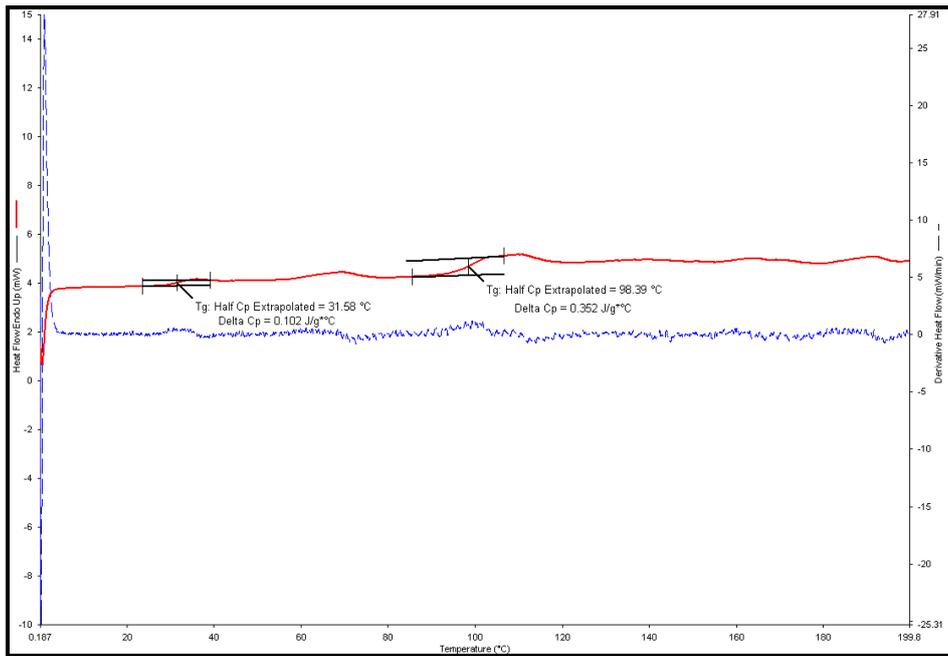


Figura B.14. Curva de DSC da Reação 15.

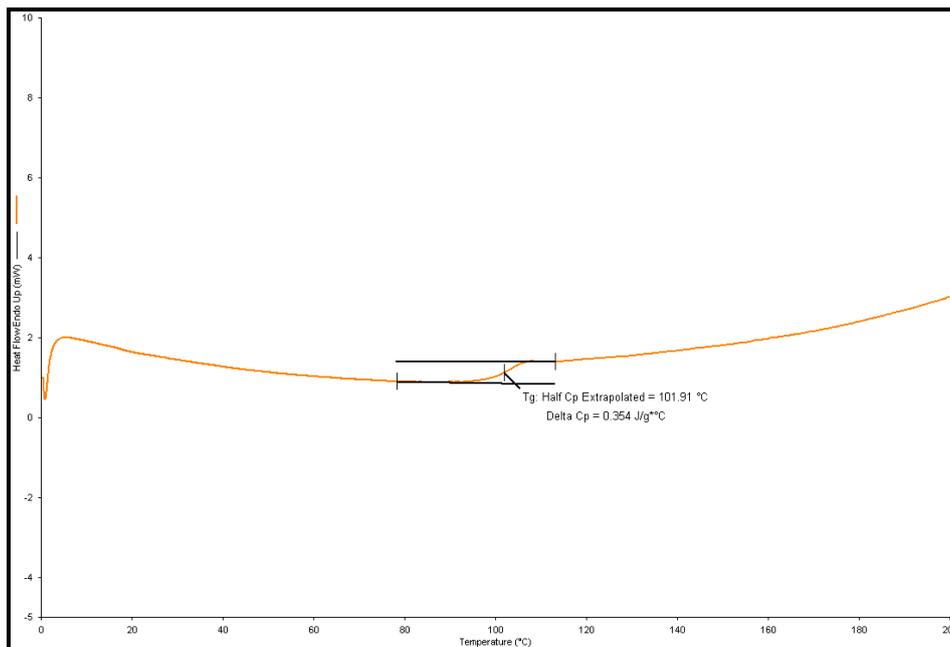


Figura B.15. Curva de DSC da Reação 16.

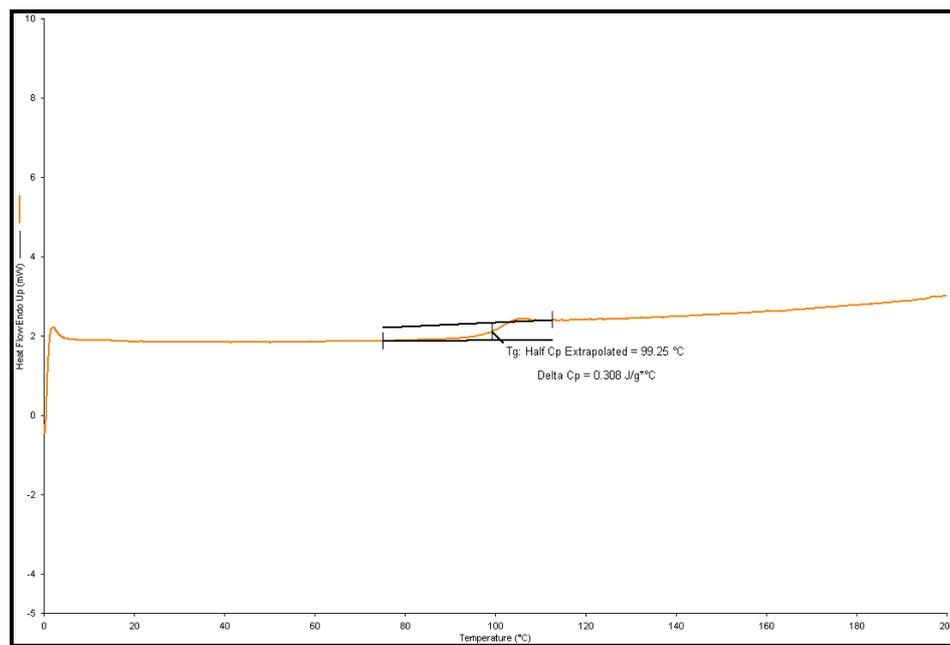


Figura B.16. Curva de DSC da Reação 17.

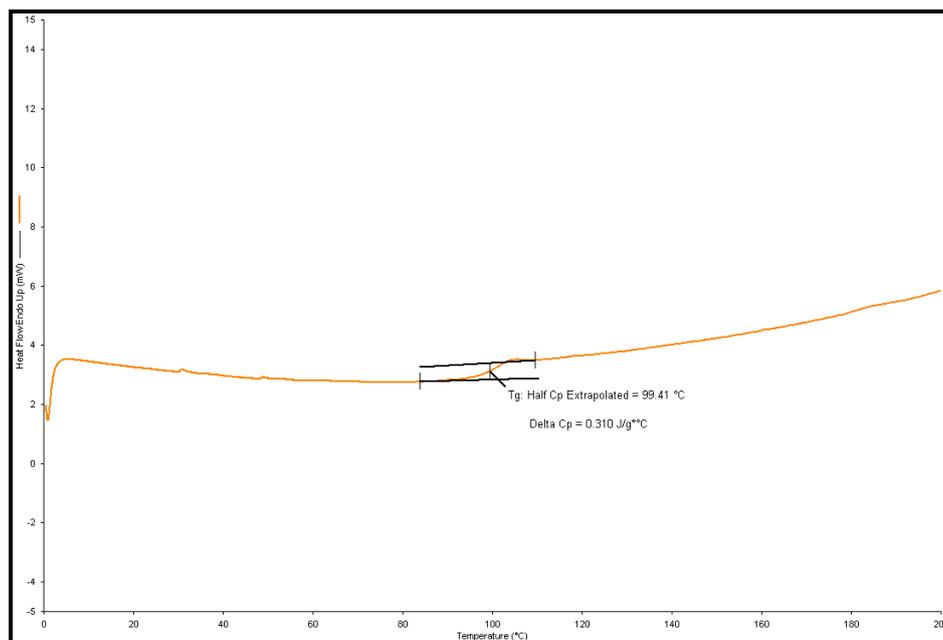


Figura B.17. Curva de DSC da Reação 18.

Referências Bibliográficas

- ACOSTA-MARTÍNEZ, V., CRUZ, L., SOTOMAYOR-RAMÍREZ, D., *et al.*, 2007, “Enzyme activities as affected by soil properties and land use in a tropical watershed”, *Applied Soil Ecology*, v. 35, pp. 35 - 45.
- AKGÖL, S., ÖZTÜRK, N., DENIZLI, A., 2009, “New Generation Polymeric Nanospheres for Catalase Immobilization”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 114, pp. 962 - 970.
- ANTONIETTI, M., TAUER, K., 2003, “90 Years of Polymer Latexes and Heterophase Polymerization: More vital than ever”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 204, pp. 207 - 219.
- ARAÚJO, P. H. H., SAYER, C., POÇO, J. G. R., *et al.*, 2002, “Techniques for Reducing Residual Monomer Content in Polymers: A Review”, *Polymer Engineering and Science*, v. 42, pp. 1442 - 1468.
- ARSHADY, R., 1992, “Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey”, *Colloid and Polymer Science*, v. 270, pp. 717 - 732.
- ASUA, J. M., 2002, “Miniemulsion polymerization”, *Progress in Polymer Science*, v. 27, pp. 1283 - 1346.
- ASUA, J. M., 2004, “Emulsion Polymerization: From Fundamental Mechanisms to Process Developments”, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 42, pp. 1025 - 1041.

- BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L., MALCATA, F. X., 1996, “Bioreactors with immobilized lipases: State of the art”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, pp. 392 - 416.
- BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C., *et al.*, 2012, “Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida Antarctica*”, *Process Biochemistry*, v. 47, pp. 1220 - 1227.
- BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISEN, P., *et al.*, 1998, “A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports”, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, pp. 486 - 493.
- BEILEN, J. B. V., LI, Z., 2002, “Enzyme technology: an overview”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 338 - 344.
- 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.
- 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., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., 2011, “Production of Core-shell Particles by Combined Semibatch Emulsion/Suspension Polymerizations”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 5, pp. 518 - 532.

- BON, E. P. S., COSTA, R. B., SILVA, M. V. A., *et al.*, 2008, “Mercado e Perspectivas de uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil”. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., *et al.* (eds), *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, 1ª ed., capítulo 20, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência.
- BORTHAKUR, L. J., DAS, D., DOLUI, S. K., 2010, “Development of core-shell nano composite of poly(styrene-co-methyl acrylate) and bentonite clay by ultra sonic assisted mini-emulsion polymerization”, *Materials Chemistry and Physics*, v. 124, pp. 1182 - 1187.
- BRADY, D., JORDAAN, J., 2009, “Advances in enzyme immobilisation”, *Biotechnology Letters*, v. 31, pp. 1639 - 1650.
- BRANCO, R. V., GUTARRA, M. L. E., FREIRE, D. M. G., *et al.*, 2010, “Immobilization and Characterization of a Recombinant Thermostable Lipase (Pf2001) from *Pyrococcus furiosus* on Supports with Different Degrees of Hydrophobicity”, *Enzyme Research*, v. 2010, pp. 1 - 8.
- BRÍGIDA, A. I. S., 2010, *Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BROOKS, B. W., 2010, “Suspension Polymerization Processes”, *Chemical Engineering and Technology*, v. 33, pp. 1737 - 1744.
- BUCHERT, J., TENKANEN, M., KANTELINEN, A., *et al.*, 1994, “Application of xylanases in the pulp and paper industry”, *Bioresource Technology*, v. 50, pp. 65 - 72.

- CABRERA, Z., FERNANDEZ-LORENTE, G., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., *et al.*, 2009, “Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 57, pp. 171 - 176.
- CASEY, B. S., MORRISON, B. R., GILBERT, R. G., 1993, “The Role of Aqueous-Phase Kinetics in Emulsion Polymerizations”, *Progress in Polymer Science*, v. 18, pp. 1041 - 1096.
- 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, aplicações e mercado*, 1ª ed., capítulo 06, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência.
- CHALAMAIAH, M., DINESH KUMAR, B., HEMALATHA, R., *et al.*, 2012, “Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review”, *Food Chemistry*, v. 135, pp. 3020 - 3038.
- CHEN, B., HU, J., MILLER, E. M., *et al.*, 2008, “*Candida antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro- and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis”, *Biomacromolecules*, v. 9, pp. 463 - 471.
- CHEN, B., MILLER, E. M., MILLER, L., *et al.*, 2007a, “Effects of Macroporous Resin Size on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Fraction of Active Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis”, *Langmuir*, v. 23, pp. 1381 - 1387.
- CHEN, B., MILLER, M. E., GROSS, R. A., 2007b, “Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity”, *Langmuir*, v. 23, pp. 6467 - 6474.

- CHEN, J., WANG, Q., HUA, Z., *et al.*, 2007c, “Research and application of biotechnology in textile industries in China”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, pp. 1651 - 1655.
- CHERN, C. S., 2006, “Emulsion polymerization mechanisms and kinetics”, *Progress in Polymer Science*, v. 31, pp. 443 - 486.
- CUI, X., ZHONG, S., WANG, H., 2007, “Emulsifier-free core-shell polyacrylate latex nanoparticles containing fluorine and silicon in shell”, *Polymer*, v. 48, pp. 7241 - 7248.
- CUNHA, A. G., 2011, *Resolução cinética de derivados de mio-inositol catalisada por lipases*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- CUNHA, A. G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., BEVILAQUA, J. V., *et al.*, 2008, “Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase — a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, pp. 49 - 56.
- CUNHA, A. G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUTARRA, M. L. E., *et al.*, 2009, “Separation and Immobilization of Lipase from *Penicillium simplicissimum* by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 156, pp. 563 - 575.
- CUNNINGHAM, M. F., 2008, “Controlled/living radical polymerization in aqueous dispersed systems”, *Progress in Polymer Science*, v. 33, pp. 365 - 398.
- DEBNATH, D., KHATUA, B. B., 2011, “Preparation by Suspension Polymerization and Characterization of Polystyrene (PS)-Poly(methyl methacrylate) (PMMA) Core-Shell Nanocomposites”, *Macromolecular Research*, v. 19, pp. 519 - 527.

- DOWDING, P. J., VINCENT, B., 2000, "Suspension polymerisation to form polymer beads", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 161, pp. 259 - 269.
- DURMAZ, Y. Y., KARAGOZ, B., BICAK, N., *et al.*, 2011, "Modification of Polydivinylbenzene Microspheres by a Hydrobromination/Click- Chemistry Protocol and their Protein- Adsorption Properties", *Macromolecular Bioscience*, v. 11, pp. 141 - 150.
- DZIOMKINA, N. V., HEMPENIUS, M. A., VANCOSO, G. J., 2006, "Synthesis of cationic core-shell latex particles", *European Polymer Journal*, v. 42, pp. 81 - 91.
- FERGUSON, C. J., RUSSELL, G. T., GILBERT, R. G., 2002, "Synthesis of latices with polystyrene cores and poly(vinyl acetate) shells. 1. Use of polystyrene seeds", *Polymer*, v. 43, pp. 6371 - 6382.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ARMISÉN, P., SABUQUILLO, P., *et al.*, 1998, "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports", *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, pp. 185 - 197.
- FIGUEIREDO, K. C. S., SALIM, V. M. M., ALVES, T. L. M., *et al.*, 2005, "Lysozyme Adsorption onto Different Supports: A Comparative Study", *Adsorption*, v. 11, pp. 131 - 138.
- FOX, T. G., FLORY, P. J., 1950, "Second-Order Transition Temperatures and Related Properties of Polystyrene. I. Influence of Molecular Weight", *Journal of Applied Physics*, v. 21, pp. 581 - 591.
- 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., CASTILHO, L. R., 2008, “Lipases em Biocatálise”. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., *et al.* (eds), *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, 1ª ed., capítulo 16, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência.
- GOKMEN, M. T., DU PREZ, F. E., 2012, “Porous polymer particles—A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications”, *Progress in Polymer Science*, v. 37, pp. 365 - 405.
- GONÇALVES, O. H., ASUA, J. M., ARAÚJO, P. H. H., *et al.*, 2008, “Synthesis of PS/PMMA Core-Shell Structured Particles by Seeded Suspension Polymerization”, *Macromolecules*, v. 41, pp. 6960 - 6964.
- GONÇALVES, O. H., MACHADO, R. A. F., ARAÚJO, P. H. H., *et al.*, 2009, “Secondary particle formation in seeded suspension polymerization”, *Polymer*, v. 50, pp. 375 - 381.
- GONZÁLEZ-SABÍN, J., GOTOR, V., REBOLLEDO, F., 2002, “CAL-B-catalyzed resolution of some pharmacologically interesting β -substituted isopropylamines”, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 13, pp. 1315 - 1320.
- GOODWIN, J. W., HEARN, J., HO, C. C., *et al.*, 1974, “Studies on the preparation and characterisation of monodisperse polystyrene latices*) III. Preparation without added surface active agents”, *Colloid and Polymer Science*, v. 252, pp. 464 - 471.
- GU, Q., LIN, Q., HU, C., *et al.*, 2005, “Study on Emulsion and Suspension In Situ Polymerization”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 95, pp. 404 - 412.

- GUISAN, J. M., SABUQUILLO, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., *et al.*, 2001, “Preparation of new lipases derivatives with high activity–stability in anhydrous media: adsorption on hydrophobic supports plus hydrophilization with polyethylenimine”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, pp. 817 - 824.
- HARKINS, W. D., 1945a, “A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 13, pp. 381 - 382.
- HARKINS, W. D., 1945b, “A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization II”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 13, pp. 47 - 48.
- HARKINS, W. D., 1947, “A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization”, *Journal of American Chemical Society*, v. 69, pp. 1428 - 1444.
- HASHEMI, M., SHOJAOSADATI, S. A., RAZAVI, S. H., *et al.*, 2012, “The Efficiency of Temperature-Shift Strategy to Improve the Production of α -Amylase by *Bacillus* sp. in a Solid-State Fermentation System”, *Food and Bioprocess Technology*, v. 5, pp. 1093 - 1099.
- HERNANDEZ, K., GARCIA-GALAN, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2011, “Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 49, pp. 72 - 78.
- HUANG, F., KE, C., KAO, C., *et al.*, 2001, “Preparation and Application of Partially Porous Poly(Styrene-Divinylbenzene) Particles for Lipase Immobilization”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 80, pp. 39 - 46.
- ILLANES, A., GONZÁLEZ, J. M., GÓMEZ, J. M., *et al.*, 2010, “Diffusional restrictions in glyoxyl-agarose immobilized penicillin G acylase of different particle size and protein loading”, *Electronic Journal of Biotechnology*, v.13, pp. 1 - 9.

- IYER, P. V., ANANTHANARAYAN, L., 2008, “Enzyme stability and stabilization - Aqueous and non-aqueous environment”, *Process Biochemistry*, v. 43, pp. 1019 - 1032.
- KAHRAMAN, M. V., BAYRAMOĞLU, G., KAYAMAN-APOHAN, N., *et al.*, 2007, “ α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment”, *Food Chemistry*, v. 104, pp. 1385 - 1392.
- KALFAS, G., RAY, W. H., 1993, “Modeling and Experimental Studies of Aqueous Suspension Polymerization Processes. 1. Modeling and Simulations”, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 32, pp. 1822 - 1830.
- KARLSSON, O. J., HASSANDER, H., WESSLÉN, B., 2000, “Influence of Seed Polymer Molecular Weight on Polymerization Kinetics and Particle Morphology of Structured Styrene–Butadiene Latexes”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 77, pp. 297 - 311.
- KENNEDY, J. T., WHITE, C. A., 1985, “Principles of immobilization of enzymes”. In: WISEMAN, A. (ed), *Handbook of Enzyme Biotechnology*, 2^a ed., chapter 04, West Sussex, England, John Wiley & Sons.
- KIM, K., KO, N. R., RHEE, S. E., *et al.*, 2012, “Molecular control of polystyrene in the reverse iodine transfer polymerization - (RITP) e Suspension process”, *Polymer*, v. 53, pp. 4054 - 4059.
- KOSKINEN, M., WILÉN, C., 2009, “Preparation of Core-Shell Latexes for Paper Coatings”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 112, pp. 1265 - 1270.
- KIPARISSIDES, C., 1996, “Polymerization Reactor Modeling: A Review of Recent Developments and Future Directions”, *Chemical Engineering Science*, v. 51, pp. 1637 - 1659.

- LANDFESTER, K., ROTHE, R., ANTONIETTI, M., 2002, "Convenient Synthesis of Fluorinated Latexes and Core-Shell Structures by Miniemulsion Polymerization", *Macromolecules*, v. 35, pp. 1658 - 1662.
- LANDFESTER, K., WILLERT, M., ANTONIETTI, M., 2000, "Preparation of Polymer Particles in Nonaqueous Direct and Inverse Miniemulsions", *Macromolecules*, v. 33, pp. 2370 - 2376.
- LEI, J., FAN, J., YU, C., *et al.*, 2004, "Immobilization of enzymes in mesoporous materials: controlling the entrance to nanospace", *Microporous and Mesoporous Materials*, v. 73, pp. 121 - 128.
- LEMOS, J. L. S., BON, E. P. S., SANTANA, M. F. E., 2000, "Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*", *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, pp. 206 - 211.
- 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.
- LENZI, M. K., LIMA, E. L., PINTO, J. C., 2006, "Detecting core-shell structure formation using near infrared spectroscopy", *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 14, pp. 1 - 9.
- LIM, D., SONG, K., YOON, K., *et al.*, 2002, "Synthesis of acrylic acid-based superabsorbent interpenetrated with sodium PVA sulfate using inverse-emulsion polymerization", *European Polymer Journal*, v. 38, pp. 579 - 586.

- LIU, W., DUAN, H., MENG, X., *et al.*, 2013, “Immobilization of *Candida lipolytica* Lipase on Macroporous Beaded Terpolymers with Epoxy Groups”, *Journal of Applied Polymer Science*, pp. 4251 - 4255.
- LUTZ, S., 2004, “Engineering lipase B from *Candida antarctica*”, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 15, pp. 2743 - 2748.
- MACHADO, F., LIMA, E. L., PINTO, J. C., 2007, “Uma Revisão Sobre os Processos de Polimerização em Suspensão”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, pp. 166 - 179.
- MADANI, M., SHARIFI-SANJANI, N., FARIDI-MAJIDI, R., 2011, “Magnetic Polystyrene Nanocapsules with Core–Shell Morphology Obtained by Emulsifier-free Miniemulsion Polymerization”, *Polymer Science, Series A*, v. 53, pp. 143 - 148.
- MANOEL, E. A., 2013, *Obtenção de Biocatalisador para Resolução Cinética de Derivados de mio-Inositol*. Exame de Qualificação, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., *et al.*, 2007, “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, pp. 1451 - 1463.
- MENDES, A. A., 2009, *Seleção de suportes e Protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel*. Tese de D.Sc., Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil.
- MILETIĆ, N., ABETZ, V., EBERT, K., *et al.*, 2010, “Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on Polystyrene Nanoparticles”, *Macromolecular Rapid Communications*, v. 31, pp. 71 - 74.

- MILETIĆ, N., VUKOVIĆ, Z., NASTASOVIĆ, A., *et al.*, 2009, “Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins — Versatile immobilization supports for biocatalysts”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, pp. 196 - 201.
- MILETIĆ, N., VUKOVIĆ, Z., NASTASOVIĆ, A., *et al.*, 2011, “Effect of *Candida antarctica* Lipase B Immobilization on the Porous Structure of the Carrier”, *Macromolecular Bioscience*, v. 11, pp. 1537 - 1543.
- NELSON, J. M., GRIFFIN, E. G., 1916, “Adsorption of invertase”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 38, pp. 1109 - 1115.
- NOMURA, M., TOBITA, H., SUZUKI, K., 2005, “Emulsion Polymerization: Kinetic and Mechanistic Aspects”, *Advances in Polymer Science*, v. 175, pp. 1 - 128.
- ODIAN, G., 2004, *Principles of Polymerization*. 4^a ed. New Jersey, USA, John Wiley & Sons.
- OKUBO, M., IZUMI, J., HOSOTANI, T., *et al.*, 1997, “Production of micron-sized monodispersed core/shell polymethyl methacrylate/polystyrene particles by seeded dispersion polymerization”, *Colloid and Polymer Science*, v. 275, pp. 797 - 801.
- OKUBO, M., IZUMI, J., TAKEKOH, R., 1999, “Production of micron-sized monodispersed core/shell composite polymer particles by seeded dispersion polymerization”, *Colloid and Polymer Science*, v. 277, pp. 875 - 880.
- OKUBO, M., LU, Y., 1996, “Production of core-shell composite polymer particles utilizing the stepwise heterocoagulation method”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 109, pp. 49 - 53.

- OLIVEIRA, P. C., ALVES, G. M., CASTRO, H. F., 2000, “Immobilisation studies and catalytic properties of microbial lipase onto styrene-divinylbenzene copolymer”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 5, pp. 63 - 71.
- OTTEWILL, R. H., SCHOFIELD, A. B., WATERS, J. A., *et al.*, 1997, “Preparation of core-shell polymer colloid particles by encapsulation”, *Colloid and Polymer Science*, v. 275, pp. 274 - 283.
- PALOMO, J. M., MUÑOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., *et al.*, 2002, “Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19 - 20, pp. 279 - 286.
- PEIXOTO, L. S., CORDEIRO, F. B., MELO, P. A., *et al.*, 2011, “Synthesis of Spherical Core-Shell PVAc-co-PMMA/PVA Particles for Use in Vascular Embolization”, *Macromolecular Symposia*, v. 299/300, pp. 132 - 138.
- PEIXOTO, L. S., MELO, P. A., NELE, M., PINTO, J. C., 2009, “Expanded Core/Shell Poly(vinyl acetate)/Poly(vinyl alcohol) Particles for Embolization”, *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 294, pp. 463 - 471.
- PEIXOTO, L. S., SILVA, F. M., NIEMEYER, M. A. L., *et al.*, 2006, “Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol) and/or Poly(Vinyl Acetate) Particles with Spherical Morphology and Core-Shell Structure and its Use in Vascular Embolization”, *Macromolecular Symposia*, v. 243, pp. 190 - 199.
- PENG, S., SONG, L., WANG, Y., *et al.*, 2011, “The suspension–emulsion combined polymerization of fluorinated acrylic monomer and the fluorinated latex film surface properties”, *Colloid and Polymer Science*, v. 289, pp. 149 - 157.
- PINTO, J. C., ALVES, T. L. M., LIMA, E. L., *et al.*, 2004a, “Processo de Preparação de Resina Polimérica com Distribuição Bimodal de Pesos Moleculares e/ou com Estrutura Casca-Núcleo e seu Uso”, *Patente nº PI0400803-0*.

- PINTO, J. C., LOPEZ, G. E., NIEMEYER, M. A. L., *et al.*, 2004b, “Processo de Síntese de Poli(Álcool Vinílico) e/ou Poli(Acetato de Vinila) com Morfologia Esférica e Estrutura Casca-Núcleo e seu Uso na Embolização Vascular”, *Patente n° PI0404994-2*.
- PINTO, J. C., LOPEZ, G. E., NIEMEYER, M. A. L., *et al.*, 2006, “Process for the Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol) and/or Poly(Vinyl Acetate) With Spherical Morphology and Shell and Nucleus Structure and Its Use in Vascular Embolization”, *Patente n° WO2006050591A2*.
- QIU, J., CHARLEUX, B., MATYJASZEWSKI, K., 2001, “Controlled/living radical polymerization in aqueous media: homogeneous and heterogeneous systems”, *Progress in Polymer Science*, v. 26, pp. 2083 - 2134.
- RAO, J. P., GECKELER, K. E., 2011, “Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters”, *Progress in Polymer Science*, v. 36, pp. 887 - 913.
- RAMIREZ, J. C., HERRERA-ORDONEZ, J., 2007, “Kinetic aspects of styrene minisuspension polymerization using a mixture PVA–SDS as stabilizer: Effect of the time of addition of SDS”, *European Polymer Journal*, v. 43, pp. 3819 - 3825.
- 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.
- RANGANATHAN, S. V., NARASIMHAN, S. L., MUTHUKUMAR, K., 2008, “An overview of enzymatic production of biodiesel”, *Bioresource Technology*, v. 99, pp. 3975 - 3981.

- REDDY, C. K., RAJU, L. Y., SRINIVAS, P. V. S. S., *et al.*, 2011, "Preparation and Characterization of Core-Shell Nanoparticles Containing Poly(chlorotrifluoroethylene-co-ethylvinylether) as Core", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 122, pp. 1807 - 1814.
- RESHMI, R., SANJAY, G., SUGUNAN, S., 2007, "Immobilization of α -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis", *Catalysis Communications*, v. 8, pp. 393 - 399.
- RIBEIRO, B. D., CASTRO, A. M., COELHO, M. A. Z., *et al.*, 2011, "Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production", *Enzyme Research*, v. 2011, pp. 1 - 16.
- SALIS, A., SANJUST, E., SOLINAS, V., *et al.*, 2003, "Characterization of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 24 - 25, pp. 75 - 82.
- SANTOS, J. G. F. Jr., 2007, *Otimização do Processo de Obtenção do Cimento Ósseo à Base de PMMA*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SAY, R., KEÇILI, R., BIÇEN, Ö., *et al.*, 2011, "A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase", *Process Biochemistry*, v. 46, pp. 1688 - 1692.
- SCHMID, A., HOLLMANN, F., PARK, J. B., *et al.*, 2002, "The use of enzymes in the chemical industry in Europe", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 359 - 366.
- SCHWAAB, M., PINTO, J. C., 2007, *Análise de Dados Experimentais I*, 1ª ed. Rio de Janeiro, Brasil, e-papers.

- SHARMA, R., CHISTI, Y., BANERJEE, U. C., 2001, "Production, purification, characterization and application of lipases", *Biotechnology Advances*, v. 19, pp. 627 - 662.
- SHAW, D. J., 1992, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. 4^a ed., Oxford, USA, Elsevier Science.
- SHELDON, R. A., 2007, "Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance", *Advanced Synthesis and Catalysis*, v. 349, pp. 1289 - 1307.
- SIGMA-ALDRICH, 2011, *Ficha de Informações de Segurança de Produtos Químicos*, disponível em: <http://www.sigmaaldrich.com/MSDS/MSDS/DisplayMSDSPage.do?country=BR&language=pt&productNumber=W323306&brand=ALDRICH&PageToGoToURL=http%3A%2F%2Fwww.sigmaaldrich.com%2Fcatalog%2Fsearch%3Finterface%3DAI%26term%3Dstyrene%26lang%3Dpt%26region%3DBR%26focus%3Dproduct%26N%3D0%2B220003048%2B219853075%2B219853286%26mode%3Dmatch%2520partialmax>, acesso em 06/02/2013.
- TAI, Y., WANG, L., GAO, J., *et al.*, 2012, "Synthesis of Core/Shell Magnetic Porous Microspheres for Lipase Immobilization", *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, v. 22, pp. 213 - 222.
- TAN, T., LU, J., NIE, K., *et al.*, 2010, "Biodiesel production with immobilized lipase: A review", *Biotechnology Advances*, v. 28, pp. 628 - 634.
- TAO, G., FURUSAKI, S., 1995, "Synthesis of porous polymer carrier and immobilization of α -chymotrypsin", *Polymer Journal*, v. 27, pp. 111 - 121.
- TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S., 2001, "Principais Métodos de Caracterização da Porosidade de Resinas à Base de Divinilbenzeno", *Química Nova*, v. 24, pp. 808 - 818.

- TISCHER, W., KASCHE, V., 1999, “Immobilized enzymes: crystals or carriers?”, *Trends in Biotechnology*, v. 17, pp. 326 - 335.
- UPPENBERG, J., OHMER, N., NORIN, M., *et al.*, 1995, “Crystallographic and Molecular Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols”, *Biochemistry*, v. 34, pp. 16838-16851.
- VAIDYA, A., GERA, G., RAMAKRISHNA, S., 2008, “Evaluation and optimization of immobilized lipase for esterification of fatty acid and monohydric alcohol”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, pp. 2987 - 2995.
- VELEV, O. D., FURUSAWA, K., NAGAYAMA, K., 1996, “Assembly of Latex Particles by Using Emulsion Droplets as Templates. 2. Ball-like and Composite Aggregates”, *Langmuir*, v. 12, pp. 2385 - 2391.
- VELLARD, M., 2003, “The enzyme as drug: application of enzymes as pharmaceuticals”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 14, pp. 444 - 450.
- 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.
- VIVALDO-LIMA, E., WOOD, P. E., HAMIELEC, A. E., 1997, “An Updated Review on Suspension Polymerization”, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 36, pp. 939 - 965.
- WANG, Q., FU, S., YU, T., 1994, “Emulsion Polymerization”, *Progress in Polymer Science*, v. 19, pp. 703 - 753.

YASUDA, M., KOBAYASHI, M., KOTANI, T., *et al.*, 2002, “Synthesis of Amphiphilic Polymer Particles by Seed Polymerization and Their Application for Lipase Immobilization”, *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 203, pp. 284 - 293.

ZHENQIAN, Z., YONGZHONG, B., ZHIMING, H., *et al.*, 2009, “Preparation of Polystyrene/Poly(Methyl Methacrylate) Core-Shell Composite Particles by Suspension-Emulsion Combined Polymerization”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 111, pp. 1659 - 1669.