



PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM POROSIDADE CONTROLADA PARA A PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES

Marina Damião Besteti

Tese de Doutorado 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 Doutor em Engenharia Química.

Orientador(es): José Carlos Costa da Silva Pinto
Denise Maria Guimarães Freire

Rio de Janeiro
Julho de 2011

PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM POROSIDADE
CONTROLADA PARA A PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES

Marina Damião Besteti

TESE 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 DOUTOR EM
CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

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

Profa. Denise Maria Guimarães Freire, D.Sc.

Prof. Tito Lívio Moitinho Alves, D.Sc.

Profa. Melissa Limoeiro Estrada Gutarra, D.Sc.

Prof. Marcelo Kaminski Lenzi, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

JULHO DE 2011

Besteti, Marina Damião

Produção de Partículas Poliméricas com Porosidade Controlada para a Preparação de Biocatalisadores/ Marina Damião Besteti. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2011.

XXII, 183 p.: il.; 29,7 cm.

Orientador: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2011.

Referências Bibliográficas: p. 163-183.

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

Aos meus pais, Rita e Luiz.

À minha irmã, Naira.

Ao meu noivo, Daniel

Agradecimentos

À Deus, pelo dom da vida e por todas oportunidades concedidas.

Aos meus pais, Rita e Luiz, meu eterno agradecimento. Palavras não são suficientes para agradecer tudo o que vocês fizeram e fazem por mim. Muito obrigada pelas (muitas) palavras de conforto e de sabedoria e por sempre se fazerem presentes, mesmo com a distância. Sem o apoio de vocês, esse trabalho não seria possível. Obrigada pela força nos momentos difíceis, em que tudo parecia impossível e por nunca terem me deixado desistir dos meus sonhos.

À minha irmã Naira, minha amiga e companheira, meu eterno obrigada. Muito obrigada por estar sempre presente, ter me ajudado infinitas vezes, pelas longas conversas e por fazer com que eu sempre acreditasse no meu potencial. Obrigada por sempre cuidar de mim.

Ao meu noivo Daniel por ser o melhor namorado, amigo e companheiro que eu poderia encontrar. Muito obrigada pelo seu infinito apoio e pela sua infinita paciência, nos muitos momentos que eu precisei. Obrigada por estar sempre ao meu lado, por acreditar e participar de todos os meus sonhos. A caminhada ao seu lado fez tudo ser mais leve e feliz.

À minha família de Pontal (SP) por toda confiança e apoio.

Um agradecimento especial à Bárbara, Aline, Laís e Luiza, pela amizade e companheirismo, que foram e são muito importantes para mim. Muito obrigada por toda ajuda quando precisei e pelos aprendizados.

Aos orientadores José Carlos Pinto e Denise Maria Guimarães Freire por aceitarem a orientação desse trabalho, pelo conhecimento compartilhado e por todos os ensinamentos.

Ao pessoal do LMSCP pela agradável convivência durante a execução dos trabalhos. À Soninha, pelas dicas e ajudas valiosas. Ao Ricardo, pelos conselhos e por

ensinar a importância da calma e paciência. À Luiza e Grazielle pela colaboração na execução de muitas análises.

Aos professores da Universidade Federal de Uberlândia, em especial à Valéria Viana Murata, que muito colaboraram na minha formação.

Um agradecimento especial aos que muito colaboraram para a execução desse trabalho: Beatriz Chagas (IMA/UFRJ) pelas análises de BET, Mariana Paixão (PAM/COPPE/UFRJ) pela ajuda nas análises de microscopia eletrônica de varredura, Giselle pela ajuda nas análises de FTIR e de ângulo de contato.

Aos amigos que fiz durante esse trabalho de tese.

Ao CNPq e à FAPERJ pelo auxílio financeiro. À PETROBRAS pelo auxílio concedido na etapa de imobilização de enzimas.

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

PRODUÇÃO DE PARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM POROSIDADE CONTROLADA PARA A PREPARAÇÃO DE BIOCATALISADORES

Marina Damião Besteti

Julho/2011

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Programa: Engenharia Química

A polimerização simultânea em suspensão e emulsão permite a obtenção de partículas poliméricas casca-núcleo com características bastante peculiares, principalmente em relação a sua porosidade, que é consequência da própria técnica de polimerização. Além disso, as composições do núcleo e da casca podem ser facilmente alteradas. Por isso, esses materiais podem ser utilizados como suporte na imobilização de enzimas. As características morfológicas das partículas casca-núcleo podem ser melhoradas por meio da adição de um agente reticulante (divinilbenzeno), que permite a obtenção de elevados valores de área específica. A maior área específica obtida neste trabalho foi de 28,7 m²/g, sendo que na ausência de divinilbenzeno esse valor era de 7,9 m²/g. Essas partículas foram empregadas na imobilização de lipase B de *Candida antarctica*, permitindo a obtenção de parâmetros de imobilização e valores de atividades de hidrólise e de esterificação similares aos da enzima comercializada como Novozyme[®] 435 e superiores aos do suporte comercial de polipropileno (Accurel[®] MP1000). Foram feitos testes de polimerização com benzoato de vinila, acetato de vinila e metacrilato de metila, para avaliar a evolução da porosidade da casca. Testes de polimerização permitiram também concluir que existe um limite máximo de vazão de alimentação de monômeros para que haja a formação da estrutura porosa do tipo casca-núcleo, útil para a imobilização de enzimas.

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

PRODUCTION OF POLYMERIC PARTICLES WITH CONTROLLED POROSITY
FOR THE PREPARATION OF BIOCATALYSIS

Marina Damião Besteti

July/2011

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Department: Chemical Engineering

The suspension/emulsion simultaneous polymerization allows the formation of core-shell polymer particles with very peculiar characteristics, especially in relation to their porosity, which is a consequence of the technique of polymerization. In addition, the compositions of the core and shell can be easily changed. Therefore, these materials can be used as support for immobilization of enzymes. The morphological characteristics of core-shell particles can be improved by the addition of a crosslinking agent (divinylbenzene), which allows to obtain high values of specific area. The largest specific area obtained in this study was 28,7 m²/g, and divinylbenzene in the absence of this value was 7,9 m²/g. These particles were used in the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*, allowing to obtain parameters of immobilization and activity values of hydrolysis and esterification similar to the enzyme marketed as Novozyme[®] 435 and higher to a polypropylene commercial support (Accurel[®] MP1000). Polymerization tests were performed with vinyl benzoate, vinyl acetate and methyl methacrylate, to analyse the evolution of the porosity of the shell. Polymerization tests have also concluded that there is a maximum flow rate of monomers for the formation of the core-shell porous structure, useful for the immobilization of enzymes.

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica	5
2.1 – Processos de Polimerização.....	5
2.1.1 – Polimerização em Suspensão	6
2.1.1.1 – Componentes da Polimerização em Suspensão.....	7
2.1.1.2 – Outras Características da Polimerização em Suspensão	9
2.1.2 – Polimerização em Emulsão	11
2.1.2.1 – Componentes da Polimerização em Emulsão	11
2.1.2.2 – Mecanismo Clássico da Polimerização em Emulsão	12
2.1.2.3 – Outras Características da Polimerização em Emulsão.....	15
2.1.3 – Polimerização Simultânea em Emulsão e Suspensão.....	16
2.1.4 – Comentários Finais.....	18
2.2 – Imobilização de Enzimas.....	19
2.2.1 – Processos Enzimáticos.....	19
2.2.2 – Imobilização de Enzimas.....	21
2.2.2.1 – Metodologias de Imobilização de Enzimas	23
2.2.3 – Suportes Utilizados na Imobilização de Enzimas.....	27
2.2.4 – Comentários Finais.....	36
Capítulo 3 – Materiais e Métodos I: Reações de Polimerização.....	37

3.1 – Unidade Experimental.....	37
3.2 – Reagentes.....	38
3.3 – Materiais e Equipamentos.....	40
3.4 – Procedimento Experimental.....	41
3.4.1 – Reações de Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão.....	42
3.4.1.1 – Reação de Polimerização em Suspensão.....	42
3.4.1.2 – Reação de Polimerização em Emulsão.....	43
3.4.2 – Reação de Saponificação.....	45
3.4.3 – Reações de Polimerização em Massa	45
3.5 – Técnicas de Caracterização.....	46
3.5.1 – Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
3.5.2 – Cromatografia de Permeação em Gel (GPC).....	47
3.5.3 – Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).....	48
3.5.4 – Área Específica e Diâmetro Médio de Poro (BET).....	49
3.5.5 – Distribuição de tamanho de Partícula (DTP).....	50
3.5.5.1 – Particle Size Distribution Analyser (PSDA).....	50
3.5.5.2 – Analisador de Tamanhos de Partícula Malvern.....	50
3.5.5.3 – Analisador de Tamanhos de Partícula ZETA SIZE-NANO.....	51
3.5.6 – Determinação do Ângulo de Contato.....	51
3.5.7 – Análise Gravimétrica.....	51
3.5.8 – Picnometria.....	52

3.5.9 – Infra Vermelho.....	53
Capítulo 4 – Materiais e Métodos II: Imobilização de Enzimas.....	55
4.1 – Materiais e Equipamentos.....	55
4.2 – Imobilização de Lipase por Adsorção Física.....	56
4.3 – Dosagem da Atividade Hidrolítica do Biocatalisador.....	58
4.4 – Determinação dos Parâmetros de Imobilização.....	58
4.5 – Dosagem da Atividade de Esterificação do Biocatalisador.....	59
4.6 – Estabilidade de Estocagem.....	60
Capítulo 5 – Resultados e Discussão I : Reações de Polimerização.....	61
5.1 – Introdução.....	61
5.2 – Polímeros Casca-Núcleo de Poli(metacrilato de metila).....	62
5.2.1 – Núcleo de Poli(metacrilato de metila).....	63
5.2.1.1 – Casca de Poli(metacrilato de metila).....	67
5.2.1.2 – Casca de Poli(metacrilato de metila-co-benzoato de vinila).....	74
5.3 – Polímeros Casca-Núcleo Contendo Divinilbenzeno.....	82
5.3.1 – Núcleo de Poli(estireno-co-divinilbenzeno).....	83
5.3.1.1 – Casca de poli(estireno).....	85
5.3.1.2 – Casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno).....	88
5.3.2 – Núcleo de Poli(estireno).....	90
5.3.2.1 – Casca de Poli(estireno-co-divinilbenzeno).....	91
5.3.3 – Núcleo de Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno).....	93

5.3.3.1 – Casca de Poli(metacrilato de metila).....	94
5.3.3.2 – Casca de Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno).....	97
5.3.4 – Núcleo de Poli(metacrilato de metila).....	99
5.3.4.1 – Casca de Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno).....	99
5.4 – Polímeros Casca-Núcleo Contendo Acetato de Vinila e Metacrilato de Metila.....	102
5.5 – Testes Iniciais – Receita de Polimerização.....	116
Capítulo 6 – Resultados e Discussão II : Imobilizações de Enzimas.....	121
6.1 – Introdução.....	121
6.2 –Reações de Hidrólise.....	123
6.3 – Reações de Esterificação.....	131
6.4– Estabilidade de Estocagem.....	135
6.5 – Análise Econômica Simplificada.....	135
Capítulo 7 – Conclusões e Sugestões.....	138
7.1 – Sugestões para Trabalhos Futuros.....	140
Apêndice A.....	141
Apêndice B.....	144
Apêndice C.....	158
Referências Bibliográficas.....	163

Lista de Figuras

Figura 2.1 – Mecanismo de formação de partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo.....	18
Figura 2.2 – Mecanismo da hiperativação de lipases pelo processo de imobilização em superfícies hidrofóbicas.....	20
Figura 2.3 – Fatores que governam as propriedades finais de uma enzima imobilizada.....	22
Figura 3.1 – Esquema da unidade experimental.....	37
Figura 5.1 – Micrografias de PMMA resultantes da polimerização em suspensão com duração de (A) 30 min, (B) 1h e (C) 2h.....	64
Figura 5.2 – Distribuição de tamanhos de partículas de (A) PMMA 30 min, (B) PMMA 1h e (C) PMMA 2h, resultantes da polimerização em suspensão.....	65
Figura 5.3 – Conversão de PMMA.....	66
Figura 5.4 – Distribuição de massas molares de PMMA (■) 30 min, (▼) 1h e (▲) 2h.....	67
Figura 5.5 – Micrografias de PMMA/PMMA (A) 30 min, (B) 1h e (C) 2h.....	69
Figura 5.6 – Distribuição de massas molares do sobrenadante de PMMA/PMMA.	70
Figura 5.7 – Distribuição de massas molares de PMMA/PMMA (■) 30 min, (●) 1h e (▲) 2h.....	71
Figura 5.8 – Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA (A) 30 min, (B) 1h e (C) 2h.....	73
Figura 5.9 – Distribuição de massas molares de R1 e R2.....	76
Figura 5.10 – Micrografias de PMMA/PMMA-BV.....	77
Figura 5.11 – Distribuição de massas molares do sobrenadante de PMMA/PMMA-BV.....	78

Figura 5.12 – Distribuição de massas molares de PMMA/PMMA-BV.....	79
Figura 5.13 – Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA/PMMA-BV.....	79
Figura 5.14 – Micrografias de PMMA/PMMA-BV SAP.....	80
Figura 5.15– Distribuição de massas molares de PMMA/PMMA-BV SAP.....	81
Figura 5.16 – Distribuição de tamanhos de partícula de PMMA/PMMA-BV SAP	82
Figura 5.17 – Micrografias de PS-DVB resultante da polimerização em suspensão.....	83
Figura 5.18 – Distribuição de tamanhos de partículas de PS-DVB.....	83
Figura 5.19 – Conversão de PS-DVB e de PS.....	84
Figura 5.20 – Micrografias de PS-DVB/PS.....	85
Figura 5.21 – Distribuição de tamanhos de partículas de PS-DVB/PS.....	87
Figura 5.22 – Micrografias de PS-DVB/PS-DVB.....	88
Figura 5.23 – Distribuição de tamanhos de partículas de PS-DVB/PS-DVB.....	89
Figura 5.24 – Distribuição de massas molares de PS resultante da polimerização em suspensão.....	90
Figura 5.25 – Micrografias de PS/PS-DVB.....	91
Figura 5.26 – Distribuição de tamanhos de partículas de PS/PS-DVB.....	92
Figura 5.27– Micrografias de PMMA-DVB.....	93
Figura 5.28 – Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA-DVB.....	93
Figura 5.29 – Conversão de PMMA-DVB e de PMMA.....	94
Figura 5.30 – Micrografias de PMMA-DVB/PMMA.....	95
Figura 5.31 – Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA-DVB/PMMA....	96

Figura 5.32 – Micrografias de PMMA-DVB/PMMA-DVB.....	97
Figura 5.33 – Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA-DVB/PMMA-DVB.....	98
Figura 5.34 – Micrografias de PMMA/PMMA-DVB.....	100
Figura 5.35 – Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA/PMMA-DVB...	101
Figura 5.36 – Micrografias de PS/PVac-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% e (H) 100%.....	104
Figura 5.37 – Distribuição de massas molares do sobrenadante de PS/PVac-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% e (H) 100%.....	108
Figura 5.38 – Distribuição de massas molares de PS/PVac-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% e (H).....	112
Figura 5.39 – Distribuição de tamanhos de partículas de PS/PVac-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% (H) 100%.....	115
Figura 5.40 – Micrografias de R3.....	118
Figura 5.41 – Distribuição de massas molares do sobrenadante de R3.....	119
Figura 5.42 – Distribuição de massas molares de R3.....	120
Figura 6.1 – Micrografias de (A) PS-DVB/PS-DVB e (B) PMMA-DVB/PMMA-DVB com CAL-B.....	134
Figura 6.2 – Teste de estabilidade de estocagem.....	135
Figura A1 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante PMMA/PMMA 30 min.....	141
Figura A2 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA/PMMA 1h.....	141
Figura A3 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA/PMMA-BV.....	142
Figura A4 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PS-DVB/PS-DVB.....	142
Figura A5 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PS/PS-DVB.....	142

Figura A6 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA-DVB/PMMA.....	143
Figura A7 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA-DVB/PMMA-DVB.....	143
Figura A8 – Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA/PMMA-DVB.....	143
Figura B1 – Curva de DSC de PMMA/PMMA 30 min.....	144
Figura B2 – Curva de DSC de PMMA/PMMA 1h.....	144
Figura B3 – Curva de DSC de PMMA/PMMA 2h.....	145
Figura B4 – Curva de DSC de REC1.....	146
Figura B5 – Curva de DSC de REC2.....	147
Figura B6 – Curva de DSC de REC3.....	148
Figura B7 – Curva de DSC de REC4.....	149
Figura B8 – Curva de DSC de PMMA/PMMA-BV.....	150
Figura B9 – Curva de DSC de PMMA/PMMA-BV SAP.....	150
Figura B10 – Curva de DSC de PS-DVB/PS.....	151
Figura B11 – Curva de DSC de PS-DVB/PS-DVB.....	151
Figura B12 – Curva de DSC de PS/PS-DVB.....	152
Figura B13 – Curva de DSC de PMMA-DVB/PMMA.....	152
Figura B14 – Curva de DSC de PMMA-DVB/PMMA-DVB.....	153
Figura B15 – Curva de DSC de PMMA/PMMA-DVB.....	153
Figura B16 – Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 40%.....	154
Figura B17 – Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 50%.....	154
Figura B18 – Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 60%.....	155

Figura B19 – Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 70%.....	155
Figura B20 – Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 80%.....	156
Figura B21– Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 90%.....	156
Figura B22 – Curva de DSC de R3.....	157
Figura C1 – Espectro de FT-IR de PMMA puro.....	158
Figura C2 – Espectro de FT-IR de PMMA R2.....	159
Figura C3 – Espectro de FT-IR de PMMA/PMMA-BV SAP.....	160
Figura C4 – Espectro de FT-IR de PS-DVB/PS.....	161
Figura C5 – Espectro de FT-IR de PMMA-DVB/PMMA.....	162

Lista de Tabelas

Tabela 3.1 – Condições reacionais usadas nas polimerizações em suspensão.....	43
Tabela 3.2 – Condições reacionais usadas nas polimerizações em emulsão.....	44
Tabela 3.3 – Condições reacionais para a reação de saponificação.....	45
Tabela 3.4 – Condições reacionais para a polimerização em massa.....	46
Tabela 5.1 – Características de polímeros casca-núcleo preparados por BESTETI (2009).....	62
Tabela 5.2 – Valores de Mw e IP de PMMA.....	67
Tabela 5.3– Valores do teor de sólidos, diâmetro médio, Mw e IP das partículas do sobrenadante de PMMA/PMMA.....	70
Tabela 5.4– Valores de Mw e IP de PMMA/PMMA.....	71
Tabela 5.5– Valores de área específica, diâmetro médio de poro e ângulo de contato de PMMA/PMMA.....	74
Tabela 5.6– Valores de Tg para a copolimerização de metacrilato de metila e benzoato de vinila em massa a 85°C.....	76
Tabela 5.7– Caracterização do sobrenadante de PS/PVAc-PMMA.....	105
Tabela 5.8– Valores de Mw e IP de PS/PVAc-PMMA.....	109
Tabela 5.9 – Valores de dos diâmetros médios de PS/PVAc-PMMA.....	112
Tabela 5.10 – Valores de Tg.....	116
Tabela 5.11 – Receitas de polimerização.....	117
Tabela 6.1 – Características dos suportes casca-núcleo.....	122
Tabela 6.2 – Parâmetros de imobilização (Atividade enzimática de entrada/Uc = 40UI).....	125
Tabela 6.3– Parâmetros de imobilização (Atividade enzimática de entrada/Uc = 400UI).....	128

Tabela 6.4 – Parâmetros de imobilização (Atividade enzimática de entrada/Uc = 800UI).....	130
Tabela 6.5 – Atividade de Esterificação (Atividade enzimática de entrada/Uc = 400UI).....	132
Tabela 6.6 – Atividade de Esterificação (Atividade enzimática de entrada/Uc = 800UI).....	132
Tabela 6.7 – Valores de matéria-prima para produção dos suportes casca-núcleo.....	136
Tabela 6.8 – Valores dos custos operacionais para produção dos suportes casca-núcleo.....	135

Nomenclatura

M_f	massa de polímero seco
M_c	massa da cápsula
M_h	massa de hidroquinona seca
M_a	massa da amostra retirada do reator de polimerização
M_1	massa do picnômetro vazio e seco (primeira etapa)
M_2	massa do picnômetro (segunda etapa)
M_3	massa do picnômetro (segunda etapa)
M_4	massa do picnômetro+amostra
M_5	massa do picnômetro+amostra+solvente
CAL-B	lipase B de <i>Candida antarctica</i>
A'	atividade lipásica, [UI/ml] ou [UI/g de suporte]
V_{final}	volume final do meio reacional [ml]
V_{am}	volume da amostra, [ml] ou massa do suporte [g]
f	fator obtido na curva de calibração de p-nitro fenol [mM]
E_{imo}	eficiência de imobilização, [%]
R_a	retenção de atividade, [%]
U_{imo}	unidades totais de enzimas imobilizadas (atividade do biocatalisador), [UI]
U_c	unidades totais de enzimas que são colocadas na etapa inicial da imobilização, [UI]
U_s	unidades totais de enzimas que não reagiram com o suporte e estão presentes no sobrenadante, [UI]
U_{teo}	unidades totais de enzimas teoricamente imobilizadas
A	atividade de esterificação, [μ mol/ min. M_{IME} ou UI/g]
V_a	volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero, [mL]
V_b	volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após o tempo t, [mL]
N	normalidade da solução de NaOH, [mmol/mL]
V_{final}	volume final de meio reacional, [mL]
M	massa da enzima imobilizada utilizada na reação, [g]

V_e	volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação, [mL]
t	tempo, [min]
DTP	distribuição de tamanhos de partículas
MMA	metacrilato de metila
BV	benzoato de vinila
VAc	acetato de vinila
PS	poli(estireno)
PMMA	poli(metacrilato de metila)
PVAc	poli(acetato de vinila)
PS casca-núcleo	polímero com núcleo e casca de poli(estireno)
PS/PS 4	polímero com núcleo e casca de poli(estireno), suspensão de 4h
PS/PMMA	polímero com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(metacrilato de metila)
PMMA/PS	polímero com núcleo de poli(metacrilato de metila) e casca de poli(estireno)
PS/PVAc	polímero com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila)
PS/PVAc-co-PMMA	polímero com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila)
PS/PS-co-PC	polímero com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(estireno-co-cardanol)
PMMA/PMMA 30 min	polímero com núcleo e casca de poli(metacrilato de metila), suspensão de 30 minutos
PMMA/PMMA 1h	polímero com núcleo e casca de poli(metacrilato de metila), suspensão de 1 hora
PMMA/PMMA 2h	polímero com núcleo e casca de poli(metacrilato de metila), suspensão de 2h
PMMA/PMMA-BV	polímero com núcleo de poli(metacrilato de metila) e casca de poli(metacrilato de metila-co-benzoato de vinila)
PMMA/PMMA-BV	polímero com núcleo de poli(metacrilato de metila) e casca de poli(metacrilato de metila-co-benzoato de vinila) e
SAP	

	saponificado
PS-DVB/PS	polímero com núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) e casca de poli(estireno)
PS-DVB/PS-DVB	polímero com núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) e casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno)
PS/PS-DVB	polímero com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno)
PMMA-DVB/PMMA	polímero de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) e casca de poli(metacrilato de metila)
PMMA-DVB/PMMA-DVB	polímero com núcleo de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) e casca de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno)
PMMA/PMMA-DVB	polímero com núcleo de poli(metacrilato de metila) e casca de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno)
PS/PVAc-PMMA	polímero com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila)
M_w	massa molar ponderal média, [Da]
IP	índice de polidispersão
T_g	temperatura de transição vítrea, [° C]
T_R	temperatura de reação, [° C]
T_{mff}	temperatura mínima de formação de filme, [° C]
D_p	diâmetro médio de poro

Símbolos Gregos

ϕ_{org}	fração orgânica do sistema (polímero e monômero)
ρ_f	massa específica da amostra
ρ_s	massa específica do solvente
η	rendimento de imobilização

CAPÍTULO 1

Introdução

A utilização de enzimas em processos industriais tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, em grande parte por causa da possibilidade de obter biocatalisadores em larga escala. A indústria química, por meio da produção de detergentes, tecidos e combustíveis é a que mais emprega enzimas em seus processos, seguida da produção de alimentos e de ração animal (KIRK *et al.*, 2002 e VAN BEILEN e LI, 2002).

A grande vantagem da aplicação de tecnologias baseadas em enzimas, em relação aos procedimentos químicos usuais, é a possibilidade de desenvolver processos mais eficientes e econômicos. Isso é possível porque usualmente ocorre a redução no número de etapas do processo e porque as condições operacionais são normalmente mais brandas, muitas vezes em temperaturas e pressões próximas às do ambiente. Em função da elevada eficiência catalítica das reações enzimáticas, as conversões atingidas são muito elevadas e praticamente não há formação de subprodutos. Esses fatores podem gerar melhorias operacionais, como a redução dos custos de operação. A utilização de enzimas é capaz de reduzir gastos de processo de 9 a 90%, permitindo economia de energia e de matéria-prima (VAN BEILEN e LI, 2002).

Entretanto, uma grande desvantagem dos processos enzimáticos é o elevado custo dos biocatalisadores, o que pode inviabilizar a sua utilização em grande escala, para a obtenção de produtos de baixo valor agregado. A solução para esse problema pode ser em parte obtida com a técnica de imobilização de enzimas. A técnica de imobilização consiste em confinar a proteína em um material sólido, de forma que o biocatalisador possa ser recuperado ao final do processo com níveis aceitáveis de atividade enzimática e possa ser reutilizado. Essa concepção introduz uma grande modificação nos processos catalisados por enzimas, uma vez que o uso de um suporte

de imobilização confere caráter heterogêneo ao processo enzimático. Nessas condições, a separação do produto final pode ser facilitada, possibilitando a sua aplicação em larga escala (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000). Atualmente, as lipases respondem por cerca de 5% do mercado mundial de enzimas e, em função de suas propriedades, como termoestabilidade, regioseletividade e estereoseletividade, a sua aplicação também por ser estendida para diversas outras áreas. Entretanto, o elevado custo de imobilização e a baixa estabilidade das enzimas dificultam a sua substituição dos catalisadores químicos (FREIRE e CASTILHO, 2008).

Ao longo dos anos, uma infinidade de materiais tem sido desenvolvida e empregada como suporte para a imobilização de enzimas, incluindo compostos inorgânicos, polímeros naturais e sintéticos e compostos constituídos por nanofibras. Cada um desses materiais possui características distintas, que influenciam de maneira diferenciada a interação com a enzima. Nesse sentido, os materiais constituídos por polímeros sintéticos têm recebido grande destaque, pois são de fácil preparação, podem apresentar morfologias e tamanhos variados, podem ser funcionalizados com os mais diversos grupos químicos e são normalmente baratos (KAHRAMAN *et al.*, 2007).

Nesse contexto, o objetivo principal desse trabalho foi desenvolver novas partículas poliméricas para uso posterior como suportes de enzimas e para a fabricação de novos biocatalisadores. Polímeros polares e apolares foram testados, com o intuito de controlar e projetar a polaridade do meio, adequando o suporte às características intrínsecas dos variados tipos de enzimas. O controle das características dos suportes produzidos pode permitir o aumento da área específica e da porosidade, sem que haja redução excessiva da densidade aparente do produto final. Os suportes foram produzidos com auxílio da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultânea, que apresenta diversas vantagens, como a possibilidade de produzir partículas porosas e a capacidade de adequar a composição das partículas às características intrínsecas de cada enzima. Os desempenhos dos suportes foram avaliados por meio de parâmetros de imobilização e de reações de hidrólise de *p*-nitrofenil laurato e esterificação de ácido oléico com etanol catalisadas com a enzima lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). A escolha da CAL-B está associada principalmente ao problema tecnológico de produção de biodiesel, já que essa enzima vem sendo amplamente usada na área. Também foram

realizados testes adicionais relacionados à modificação da receita de polimerização, para verificação dos efeitos sobre a porosidade em polímeros contendo acetato de vinila e metacrilato de metila.

Esta tese está estruturada em sete capítulos, contando com a presente Introdução. O Capítulo 2 apresenta uma revisão bibliográfica sobre os processos de polimerização em suspensão e emulsão, bem como a descrição completa do processo de polimerização simultânea em suspensão e emulsão. Além disso, o Capítulo 2 apresenta uma revisão sobre a importância da técnica de imobilização enzimática e as características envolvidas nos principais processos de imobilização de enzimas. As propriedades morfológicas e químicas de diferentes suportes já desenvolvidos, assim como os efeitos que causam sobre a atividade enzimática, também são abordadas. No Capítulo 3 é apresentada a metodologia experimental das reações de polimerização e as técnicas usadas para caracterização das partículas finais obtidas. O Capítulo 4 apresenta a metodologia experimental usada para a imobilização de CAL-B e também a descrição das reações de hidrólise e esterificação realizadas pelo biocatalisador (suporte com enzima). No Capítulo 5 são descritos todos os suportes poliméricos produzidos para emprego como suporte enzimático, bem como as respectivas análises de caracterização. Além disso, são apresentados alguns testes de polimerização e os efeitos causados sobre as características finais das partículas casca-núcleo. No Capítulo 6 são apresentados os resultados referentes à atividade enzimática durante e após a imobilização de CAL-B nos suportes casca-núcleo, assim como é feita uma comparação com o desempenho de suportes comerciais. Faz-se ainda uma análise econômica simplificada, para ilustrar a viabilidade econômica de utilização dos polímeros desenvolvidos. O Capítulo 7 traz as principais conclusões desse trabalho e sugestões para trabalhos futuros. O Apêndice A apresenta as distribuições de tamanhos das partículas presentes no sobrenadante, após a polimerização simultânea em suspensão e emulsão. O Apêndice B apresenta as análises de calorimetria diferencial de varredura (DSC) dos produtos poliméricos finais. O Apêndice C apresenta os espectros de infravermelho dos materiais produzidos.

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Modelagem, Simulação e Controle de Processos (LMSCP) do Programa de Engenharia Química da COPPE /UFRJ. A tese se enquadra na linha de desenvolvimento de novos materiais em sistemas

de polimerização. As etapas de imobilização de enzimas, avaliação dos parâmetros de imobilização e estudos da cinética enzimática após o emprego dos suportes desenvolvidos foram realizados em colaboração com o Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LaBiM) do Instituto de Química/UFRJ.

CAPÍTULO 2

Revisão Bibliográfica

O objetivo desse capítulo é descrever os sistemas de polimerização em emulsão e em suspensão por radicais livres e também o sistema que combina esses dois processos - a polimerização simultânea em suspensão e emulsão. Em seguida, descreve-se a importância dos processos enzimáticos e os procedimentos de imobilização de enzimas mais empregados. As características químicas e morfológicas dos materiais comumente empregados como suporte na imobilização de enzimas serão apresentadas, bem como o efeito dessas propriedades sobre a atividade catalítica da enzima.

2.1. Processos de Polimerização

As reações de polimerização podem ocorrer basicamente por dois mecanismos: reações em etapas ou reações em cadeia (ODIAN, 2004). Na reação em etapas, o crescimento da cadeia ocorre mais lentamente, por meio da reação entre grupos funcionais de espécies em crescimento. Nesse caso, são utilizados monômeros multifuncionais e a polimerização ocorre entre grupos químicos específicos. A reação em cadeia, por sua vez, é iniciada por uma espécie reativa, capaz de incorporar uma molécula de monômero, gerando uma nova espécie reativa. Dessa forma, a adição contínua de unidades monoméricas pela espécie ativa, leva ao crescimento das cadeias de polímero. A reação em cadeias pode ser promovida por diversos catalisadores e por radicais livres. O mecanismo básico da polimerização por radicais livres pode ser dividido em três etapas: iniciação (produção da espécie ativa e ativação da primeira molécula de monômero), propagação (crescimento das cadeias) e terminação (ODIAN, 2004).

Os processos de polimerização podem ser homogêneos ou heterogêneos. As reações homogêneas, como as polimerização em massa e em solução, são conduzidas em uma única fase e são caracterizadas pela elevada viscosidade. Nos processos heterogêneos existem ao menos duas fases, sendo que o monômero e o polímero ficam

usualmente dispersos em uma fase contínua imiscível (comumente utiliza-se água) (ODIAN, 2004).

Neste trabalho, as reações de polimerização foram conduzidas pelo mecanismo de radicais livres por meio de processos heterogêneos, que são as polimerizações em suspensão e emulsão, descritas a seguir.

2.1.1. Polimerização em Suspensão

A polimerização em suspensão é um processo em que um ou mais monômeros insolúveis são dispersos em água (geralmente a fase contínua é constituída de água), formando gotas de material orgânico. Essa dispersão é mantida por meio da utilização de agentes estabilizantes e de uma intensa agitação. Cada gota desse sistema funciona como um mini-reator de polimerização em massa. Nas gotas está presente o monômero e também o iniciador. Ao longo do processo, à medida que a polimerização avança, as gotas tornam-se cada vez mais viscosas, até formarem as partículas sólidas (NI *et al.*, 1998; ODIAN, 2004; KOTOULAS e KIPARISSIDES, 2006).

A polimerização em suspensão é um processo capaz de produzir partículas poliméricas com formato esférico bem definido e com tamanhos na faixa de 5 – 1000 μm (LIN *et al.*, 2010). A técnica de polimerização em suspensão é usada para a fabricação de diversos materiais comercialmente importantes, como poli(cloreto de vinila) (PVC), copolímeros de monômeros acrílicos e copolímeros de estireno (por exemplo, resinas de acrolonitrila-butadieno-estireno, ABS e resinas de estireno-acrilonitrila, SAN), poli(estireno) expandido (EPS) (GONÇALVES *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009), além de materiais particulados usados como meios de separação cromatográfica (JAHANZAD *et al.*, 2005).

A polimerização em suspensão apresenta cinco tipos principais (MACHADO *et al.*, 2007): suspensão do tipo pérola (o polímero é solúvel no monômero), suspensão do tipo granular (o polímero é insolúvel no monômero e as partículas geradas são porosas e formadas por agregados de partículas menores, resultantes da precipitação do polímero), massa-suspensão ou semi-suspensão (realizada em duas etapas, com uma polimerização em massa seguida de uma polimerização em suspensão), suspensão inversa (a fase

contínua é constituída por um solvente orgânico e as gotas dispersas são formadas por soluções aquosas de monômero e polímero) e micro-suspensão (partículas muito pequenas são produzidas por meio de intensa agitação e emprego de misturas de agentes estabilizantes). Neste trabalho, a polimerização em suspensão empregada foi sempre a do tipo pérola. Como o polímero formado é solúvel no próprio monômero, a polimerização pode ser dividida em três estágios (YUAN *et al.*, 1991; KIPARISSIDES, 1996; MACHADO *et al.*, 2007):

1. Quando a polimerização se inicia, existe um equilíbrio dinâmico entre as taxas de quebra e coalescência das gotas de monômero e a viscosidade do meio é bastante baixa. O sistema é constituído por uma mistura líquido-líquido;
2. À medida que a polimerização avança, ocorre aumento considerável da viscosidade da fase orgânica e as partículas ficam pegajosas. O controle da distribuição de tamanhos de partículas fica bastante complicado, pois a taxa de coalescência é intensa. O final dessa etapa ocorre quando se atinge o Ponto de Identificação de Partícula (PIP), com conversões na faixa de 65 a 80%, quando as taxas de quebra e coalescência cessam e o tamanho das partículas fica controlado e definido.
3. Se o sistema estiver estável, os fenômenos de quebra e coalescência cessam após o PIP e o tamanho final das partículas fica bem estabelecido. Caso contrário, as partículas coalescem, formando um imenso aglomerado

A polimerização em suspensão do tipo pérola é muito usada para a produção de poli(estireno), poli(metacrilato de metila) e poli(acetato de vinila) (ODIAN, 2004).

2.1.1.1. Componentes da Polimerização em Suspensão

A polimerização em suspensão apresenta algumas características fundamentais, que serão descritas a seguir.

A) Agitação Mecânica

A agitação mecânica é uma variável muito importante para a polimerização em suspensão, pois colabora com a manutenção da completa dispersão das gotas na fase contínua e também influencia a distribuição final de tamanhos de partículas. De maneira geral, quanto maior a velocidade de agitação, menor é o tamanho das partículas de polímero, pois ocorre maior quebra das gotas de monômero nos campos de cisalhamento mais intensos. Entretanto, podem também ser observados alguns efeitos conflitantes em relação à velocidade de agitação e o tamanho das partículas. Por exemplo, o aumento da velocidade de agitação pode ocasionar aumento da taxa de coalescência das partículas por causa do aumento da frequência de choques (RAMIREZ e HERRERA-ORDONEZ, 2007; MACHADO *et al.*, 2007). A forma das pás e o posicionamento do impelidor influenciam o comportamento hidrodinâmico do sistema e, conseqüentemente, a distribuição de tamanhos de partículas (NI *et al.*, 1998; GONÇALVES *et al.*, 2009).

B) Agentes de Suspensão

O agente de suspensão é um estabilizante que atua na interface entre a água e a gota de monômero, formando uma fina camada que impede a coalescência descontrolada das partículas. Além disso, agentes de suspensão reduzem a tensão interfacial, contribuindo com a estabilização de gotas menores (RAMIREZ e HERRERA-ORDONEZ, 2007). Os agentes de suspensão podem ser compostos inorgânicos insolúveis em água (como kaolim e hidroxiapatita) ou polímeros parcialmente solúveis em água (como poli(álcool vinílico) e hidroxipropil celulose) (ODIAN, 2004).

O mais comum agente de suspensão usado em polimerizações em suspensão é o poli(álcool vinílico) (PVA), pois é um polímero solúvel em água que pode ser produzido com diversas massas molares e graus de hidrólise (conteúdo de OH) (ODIAN, 2004; JAHANZAD *et al.*, 2005). A escolha do agente de suspensão é de extrema importância, uma vez que esse componente determina a estabilidade das gotas de monômero antes e durante a polimerização, prevenindo a coalescência e afetando a distribuição final de tamanhos de partículas (GEORGIADOU e BROOKS, 2006).

C) Iniciadores

Os iniciadores são responsáveis pela geração da espécie ativa que inicia o processo de incorporação das moléculas de monômero, levando ao crescimento das cadeias. A decomposição dos iniciadores (e geração dos radicais livres) pode ser promovida de diferentes formas, como por aumento de temperatura, por incidência de luz e também por reações químicas de oxi-redução. A forma mais comum é por meio do aumento da temperatura, pois os custos operacionais são usualmente menores. Nesse caso, é importante que a temperatura do meio reacional seja aproximadamente igual à temperatura de meia vida, que é a temperatura na qual a concentração cai à metade no tempo característico da reação (ODIAN, 2004).

Na polimerização em suspensão o iniciador empregado é solúvel na fase monomérica. O iniciador mais comum deles é o peróxido de benzoíla (BPO), devido ao seu menor custo, facilidade de manuseio e segurança de manipulação. Outros tipos de iniciadores podem também ser usados, como azocompostos (ODIAN, 2004). Por estarem presentes no interior das gotas de monômero, a concentração de iniciador pode ser bastante elevada, gerando baixos valores de massa molar ponderal média, já que muitas cadeias podem ser iniciadas simultaneamente (LENZI *et al.*, 2003). Além disso, por serem extremamente reativos e não apresentarem qualquer especificidade, os radicais podem não ter tempo de difundir no meio, sofrendo terminação antes de iniciarem as moléculas de monômero, o que caracteriza o Efeito Gaiola e justifica as relativamente baixas eficiências de iniciação (DOTSON *et al.*, 1996; KIPARISSIDES, 1996).

2.1.1.2. Outras Características da Polimerização em Suspensão

Um aspecto muito importante da polimerização em suspensão é a determinação da distribuição final de tamanhos de partículas (DTP). Essa é uma propriedade complexa, de difícil controle e modelagem. As distribuições de tamanhos das gotas e das partículas finais de polímero dependem de uma série de fatores, como tipo e concentração de agente estabilizante, da agitação, do tipo de reator, das propriedades físicas da fase dispersa e da mudança de viscosidade da fase dispersa ao longo do tempo (VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2000; HASHIM e BROOKS, 2002; KOTOULAS e KIPARISSIDES, 2006).

A DTP das partículas de polímero é controlada por dois fatores, que são as taxas de quebra e de coalescência das gotas. Em geral, o fenômeno de quebra ocorre em regiões próximas do agitador, onde as gotas e/ou as partículas poliméricas estão submetidas a intensa tensão de cisalhamento. A coalescência está relacionada com a baixa solubilidade do monômero no meio e ocorre principalmente nas regiões mais afastadas do impelidor (KOTOULAS e KIPARISSIDES, 2006).

O efeito gel (efeito Trommsdorf) está relacionado ao aumento das conversões no meio de reação. Esse efeito está associado à queda da taxa de terminação, já que o aumento da viscosidade do meio dificulta a mobilidade das cadeias de polímero, resultando no aumento das taxas de reação. Por isso, o efeito gel pode causar descontrole térmico da reação. Como consequência do efeito gel, algumas propriedades finais dos materiais podem ser alteradas, levando à produção de resinas com massas molares maiores e maiores índices de polidispersão (KIPARISSIDES, 1996; POLLACO *et al.*, 1996).

À medida que a polimerização avança, as gotas de monômeros se transformam em partículas de polímero, com conseqüente aumento da temperatura de transição vítrea (T_g). Se a T_g do meio reacional se tornar superior à temperatura da reação, a mobilidade das cadeias diminui drasticamente, gerando resistências difusionais às taxas de propagação que reduzem a velocidade de reação (ODIAN, 2004).

A polimerização em suspensão apresenta inúmeras vantagens, como: (i) a morfologia das partículas é bem definida, fato muito importante para diversas aplicações; (ii) como há um meio contínuo, a transferência de calor fica facilitada, diminuindo a possibilidade de descontrole da reação e dificultando a formação de agregados e incrustações; (iii) ao final da reação, a separação dos componentes é bem simples; (iv) baixos níveis de impurezas (LENZI, 2002; VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997).

Entretanto, a polimerização em suspensão também apresenta algumas desvantagens, como: (i) não existem processos contínuos, por conta do risco de incrustação; (ii) reações envolvendo copolímeros não são controladas de forma eficiente, sendo que os materiais formados apresentam uma composição aleatória e estão sujeitos a desvios de composição ao longo da batelada; (iii) eventualmente pode

haver incrustações, ocasionando prejuízos à operação do processo (LENZI, 2002; VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997).

2.1.2. Polimerização em Emulsão

A polimerização em emulsão é extensamente aplicada para a síntese de diversos materiais poliméricos, como vernizes, tintas e adesivos, tratando-se de um processo único para a produção de látex (dispersão de partículas com tamanhos na faixa de 50-500 nm). A técnica de polimerização em emulsão apresenta muitas vantagens, quando comparada a outros sistemas de polimerização, principalmente por causa da sua natureza compartimentalizada. Além das diferenças físicas, há uma distinção cinética que é de fundamental importância: não existe uma relação direta entre a massa molar do polímero final e as taxas de reação. Nesses sistemas, a massa molar é controlada pela taxa de geração de radicais livres, enquanto a velocidade de reação é controlada pela concentração de partículas dispersas. Nos outros tipos de polimerização, essa relação é inversa: o aumento das taxas de iniciação causa aumento da velocidade de reação e redução das massas molares (SANTOS *et al.*, 2006; ARORA *et al.*, 2007; ARUNBABU *et al.*, 2008; CUNNINGHAM, 2008).

Muitas propriedades do látex oriundo da polimerização em emulsão (como estabilidade, viscosidade, textura, capacidade de formar filme entre outras) estão diretamente ligadas à distribuição dos tamanhos de partículas, de forma similar ao que ocorre na polimerização em suspensão. O forte acoplamento existente entre a cinética de reação e as distribuições de tamanhos de partícula, no entanto, torna o processo complexo e muito sensível a perturbações (SANTOS *et al.*, 2006; SROUR *et al.*, 2007, ALB e REED, 2008). As polimerizações em emulsão são usualmente conduzidas em vasos de mistura agitados. Nesses sistemas, no entanto, a velocidade de agitação e geometria das pás não são muito importantes, pois as partículas são formadas por nucleação micelar ou precipitação das cadeias poliméricas (LOVELL e EL-AASSER, 1997).

2.1.2.1. Componentes da Polimerização em Emulsão

A seguir serão descritos os principais componentes de uma polimerização em emulsão.

A) Emulsificante/Surfactante

Os emulsificantes são moléculas constituídas por um segmento hidrofóbico e outro segmento hidrofílico. Os emulsificantes mais comuns são aniônicos, como o lauril sulfato de sódio (SLS) e o dodecil sulfato de sódio (SDS). Os emulsificantes exercem, basicamente, duas funções: (i) estabilizam a gota de monômero e a partícula de polímero formada; (ii) atuam na nucleação e crescimento dessas partículas (WANG *et al.*, 2001; ODIAN, 2004; CHAIYASAT *et al.*, 2008).

O excesso de surfactante presente no meio reacional gera micelas, que são agregados de moléculas organizadas espacialmente e que possuem de 5 a 10 nm de diâmetro. Isso só é possível quando o surfactante encontra-se acima de sua concentração micelar crítica (CMC), que é o limite de solubilidade do emulsificante no meio. Em geral, as polimerizações são iniciadas no interior dessas micelas que funcionam como núcleos das partículas de polímero geradas (KIPARISSIDES, 1996; ODIAN, 2004).

B) Iniciadores

No caso da polimerização em emulsão, o iniciador empregado (em geral, utiliza-se o persulfato de potássio, de sódio ou de amônio) é solúvel apenas na fase aquosa. Após a decomposição, os radicais gerados reagem com a pequena fração de monômero que fica dissolvida na fase contínua, formando espécies hidrofóbicas. Esses radicais nucleiam então as micelas ou partículas de polímero pré-existentes (ODIAN, 2004; BRIJMOHAN, 2005; CUNNINGHAM, 2008).

Além do emulsificante e do iniciador, outras substâncias também podem ser empregadas durante a polimerização em emulsão, como tampões, cuja finalidade é conferir maior estabilidade ao látex formado (LENZI, 2002).

2.1.2.2. Mecanismo Clássico da Polimerização em Emulsão

HARKINS (1945a, 1945b, 1947) desenvolveu o mecanismo clássico da polimerização em emulsão, que até hoje é usado com poucas modificações. Simplificadamente, as principais características mecanísticas desse sistema são:

- A presença do emulsificante é determinante para a ocorrência da polimerização em emulsão, pois gera as micelas (onde ocorre a nucleação da partícula de polímero) e estabiliza as gotas de monômero e as partículas formadas. À medida que o polímero é formado, parte do surfactante é consumido e fica adsorvido em sua superfície. O tamanho das partículas e as taxas de reação estão diretamente relacionados com a quantidade de emulsificante usada;
- A gota de monômero funciona apenas como um reservatório de material que, ao longo da reação, vai se difundindo para o interior das partículas. Os radicais livres gerados na fase aquosa entram nas micelas e partículas de polímero, onde ocorre de fato a polimerização. Após a nucleação, as partículas formadas permanecem inchadas com o monômero;
- A reação só chega ao fim quando um segundo radical entra na partícula. Devido ao pequeno volume da partícula, a terminação é quase imediata. Se no interior da partícula não houver nenhum outro radical, inicia-se uma nova fase de reação.

O processo de polimerização em emulsão pode ser dividido em três etapas principais (VANDERHOFF, 1993; IMMANUEL *et al.*, 2002; ODIAN, 2004; NOMURA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2006; CUNNINGHAM, 2008), como mostrado a seguir.

1. Nucleação das Partículas

A nucleação de partículas constitui um conjunto de fenômenos bastante complexo, dependendo das condições operacionais utilizadas, como as concentrações de iniciador e de surfactante, a temperatura reacional e a solubilidade do monômero na fase aquosa. A formação das primeiras partículas é bem rápida, mas essa etapa é fundamental para determinação da distribuição de tamanhos das partículas finais.

Basicamente, a nucleação se inicia quando o iniciador presente na fase contínua gera radicais que reagem com o monômero dissolvido nessa fase. O tipo de nucleação que pode ocorrer depende muito da solubilidade do monômero na água. A nucleação é dita micelar (heterogênea), quando ocorre exclusivamente no interior das micelas. Por outro lado, a nucleação é dita homogênea quando as cadeias de polímero formadas na água se aglomeram para formar partículas. Após serem formadas, as partículas de polímero absorvem parte do emulsificante presente no meio reacional (ODIAN, 2004). Essa etapa é caracterizada pelo aumento do número de partículas de polímero e se estende tipicamente até conversões de 1 a 2%.

2. Crescimento das Partículas

Nessa etapa, as partículas de polímero crescem continuamente e consomem todo o monômero presente nas gotas. Em função do caráter compartimentalizado desse tipo de polimerização, as taxas de reação são muito elevadas. Por isso, o crescimento de cadeias é rápido, bem como o aumento do tamanho das partículas. Essa etapa é caracterizada pela velocidade de reação constante e se estende tipicamente até conversões de 60-70%.

3. Esgotamento de Monômero

Na etapa final, todo o monômero presente no meio reacional (nas partículas de polímero) é consumido. Em geral, as conversões chegam a valores próximos de 100%. Ao final dessa etapa, como a viscosidade no interior das partículas de polímero é consideravelmente alta, o efeito gel torna-se pronunciado, podendo ocorrer um descontrole de temperatura. O tamanho final das partículas fica entre os tamanhos das micelas (2-10 nm) e das gotas de monômero (1-10 μm).

A descrição matemática do mecanismo proposto por HARKINS foi feita por SMITH e EWART (1948), sendo capaz de descrever a grande maioria dos dados experimentais disponíveis até hoje, apesar de muitos outros modelos terem sido propostos para esse fim. Fundamentalmente, dois aspectos devem ser levados em conta: as variáveis que controlam as taxas de polimerização e o número de partículas formadas.

Em relação às taxas de reação, as taxas de formação e terminação de radicais livres e as taxas de sorção e dessorção de radicais das partículas de polímero devem ser consideradas. Em função da importância relativa de cada um desses termos, o número médio de radicais livres nas partículas pode variar em ampla faixa de valores. Se as taxas de iniciação controlam o sistema e as taxas de dessorção são baixas, o número médio de radicais por partícula é igual a 0.5 (LENZI, 2002).

O número de partículas formadas está relacionado diretamente com a quantidade de micelas no meio. Portanto, o número de partículas é controlado pelas quantidades de emulsificantes adicionadas ao meio (LENZI, 2002).

2.1.2.3. Outras Características da Polimerização em Emulsão

Existem alguns outros sistemas de polimerização em emulsão que também são muito importantes e são um pouco diferentes dos sistemas clássicos:

- **Miniemulsão** - A formação das partículas ocorre nas próprias gotas de monômero. Para isso, faz-se uma dispersão muito fina das gotas, com auxílio de elevadas taxas de cisalhamento e de uma elevada concentração de emulsificante. Por isso, a formação de micelas deve ser evitada (SCHORK, 1999; SUZUKI *et al.*, 1999; SAJJADI, 2007; CUNNINGHAM, 2008);
- **Emulsão livre de emulsificante** - Nesse caso, o iniciador também tem a função de estabilizar as partículas de polímero, formando espécies que se adsorvem na interface entre o meio aquoso e as partículas de polímero. A formação das partículas ocorre fundamentalmente pelo mecanismo da nucleação homogênea (ODIAN, 2004);
- **Emulsão Inversa** - O monômero é solúvel na fase aquosa, sendo necessária a utilização de um diluente orgânico para constituir a fase contínua (ODIAN, 2004).

A polimerização em emulsão apresenta inúmeras vantagens: (i) a possibilidade de gerar materiais poliméricos com elevadas massas molares com altos valores de conversão; (ii) o produto final pode ser usado diretamente, não sendo necessário nenhum tipo de purificação; (iii) a viscosidade do meio não é alta, o que facilita o

controle térmico da reação (KIPARISSIDES, 1996; LENZI, 2002). Contudo, algumas desvantagens também podem ser apontadas: (i) a natureza compartimentalizada da polimerização torna difícil o controle das propriedades do polímero; (ii) a presença de emulsificante dificulta a purificação (KIPARISSIDES, 1996; LENZI, 2002).

2.1.3. Polimerização Simultânea em Emulsão e Suspensão

Polímeros com morfologia casca-núcleo são formados por pelo menos dois materiais poliméricos distintos, organizados como um núcleo interno e uma camada externa, apresentando diferentes propriedades químicas, físicas e morfológicas. Essas partículas permitem a combinação de materiais com propriedades diferentes, tornando possível a produção de blendas e compósitos com melhor desempenho (VELEV *et al.*, 1996; GU *et al.*, 2005; PUSCH e VAN HERK, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2007). Esses materiais podem encontrar diversas aplicações: revestimentos funcionais, materiais sensíveis à temperatura, sensores, catalisadores, componentes eletrônicos, materiais ópticos, entre muitos outros (VELEV *et al.*, 1996; PEDRAZA e SOUCEK, 2005; JONSSON *et al.*, 2006; CAI *et al.*, 2007; CUI e WANG, 2007; SANCHÉZ-SILVA *et al.*, 2010).

Vários processos podem ser utilizados para a produção de partículas de polímero com morfologia núcleo-casca, como polimerizações em emulsão (FERGUSON *et al.*, 2002; CUI e WANG, 2007), em miniemulsão (LANDFESTER *et al.*, 2002; BORTHAKUR *et al.*, 2010), em dispersão (OKUBO *et al.*, 1999; SRISOPA *et al.*, 2011) e em suspensão (RAMIREZ e HERRERA-ORDONEZ, 2007; GONÇALVES *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009; LIN *et al.*, 2010), tanto em modo batelada como batelada alimentada. Os componentes da casca e do núcleo podem ser materiais poliméricos ou compósitos híbridos, formados pela mistura de polímeros com substâncias inorgânicas, tais como sílica e hidroxiapatita (VELEV *et al.*, 1996; GU *et al.*, 2005; PUSCH e VAN HERK, 2005; OKAMOTO *et al.*, 2007).

Particularmente, partículas casca-núcleo também podem ser produzidas por meio da combinação dos processos de polimerização em suspensão e emulsão (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003; ZHENQIAN *et al.*, 2009; PENG *et al.*, 2011). LENZI *et al.* (2003) desenvolveram uma metodologia que combina as receitas típicas de polimerização em

suspensão e em emulsão para a produção poli(estireno) casca-núcleo. Na primeira etapa do processo, um núcleo não-poroso é produzido através de uma polimerização em suspensão tradicional. Em seguida, na segunda etapa do processo, os constituintes de uma polimerização em emulsão clássica devem ser adicionados ao sistema (em que a reação em suspensão já está ocorrendo). A alta viscosidade e a natureza pegajosa dos núcleos promove a aglomeração de partículas emulsificadas ao seu redor, gerando as partículas com morfologia casca-núcleo. A formação da casca pode ser detectada por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) (LENZI *et al.*, 2006). A aglomeração de nanopartículas ao redor do núcleo leva à formação de poros, tornando o material adequado para ser empregado como suporte na imobilização de enzimas (PINTO *et al.*, 2004a; FIGUEIREDO *et al.*, 2005).

A espessura da casca depende das características do núcleo no momento em que os componentes da polimerização em emulsão são alimentados; ou seja, depende da duração da etapa de suspensão. Se os componentes da polimerização em emulsão são adicionados quando a conversão do núcleo é suficientemente baixa, a aglomeração de partículas é mais intensa; ou seja, a captura das nanopartículas é bastante eficiente. Caso contrário, se a conversão do núcleo estiver em um valor muito elevado, a sua viscosidade é tão grande que as partículas do núcleo se comportam como sólidos e a captura das partículas emulsificadas não é satisfatória, gerando cascas mais finas e com recobrimento menos uniforme.

LENZI *et al.* (2005) desenvolveram um modelo para explicar as propriedades moleculares dos polímeros casca-núcleo produzidos, mostrando que a distribuição de massas molares depende das taxas de aglomeração das nanopartículas ao redor do núcleo (ou seja, da espessura da casca) . Como demonstrado por meio de simulação, a aglomeração de partículas, quando a conversão é mais baixa, leva à perda da natureza compartimentalizada dos processos em emulsão. Nesse caso, as características das partículas casca-núcleo são similares às das partículas geradas apenas pela polimerização em suspensão. Posteriormente, ZHENQIAN *et al.* (2009) produziram partículas de polímero com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(metacrilato de metila) pelo mesmo processo e utilizou o mesmo mecanismo para explicar os resultados obtidos. PENG *et al.* (2011) também utilizaram essa metodologia para a produção de polímeros de acrilatos fluorinados.

BESTETI (2009) utilizando a técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão, combinou diversas composições no núcleo e na casca, de forma a analisar os efeitos dessas mudanças sobre a morfologia do produto final. Foi constatado que a temperatura de transição vítrea (T_g) é a variável determinante para a formação de casca porosa. Quando os componentes da emulsão exibiam valores de T_g abaixo da temperatura do meio reacional, como no caso do poli(acetato de vinila) e de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila), ocorria a formação de um filme ao redor do núcleo, sem qualquer porosidade. Entretanto, composições de casca em que a T_g ficava acima da temperatura de reação conduziam a materiais com boas características de porosidade, caso da casca de poli(estireno), poli(estireno-co-cardanol), poli(metacrilato de metila) e poli(metacrilato de metila) saponificado. O mecanismo proposto por BESTETI (2009) para explicar esses comportamentos está ilustrado na Figura 2.1.

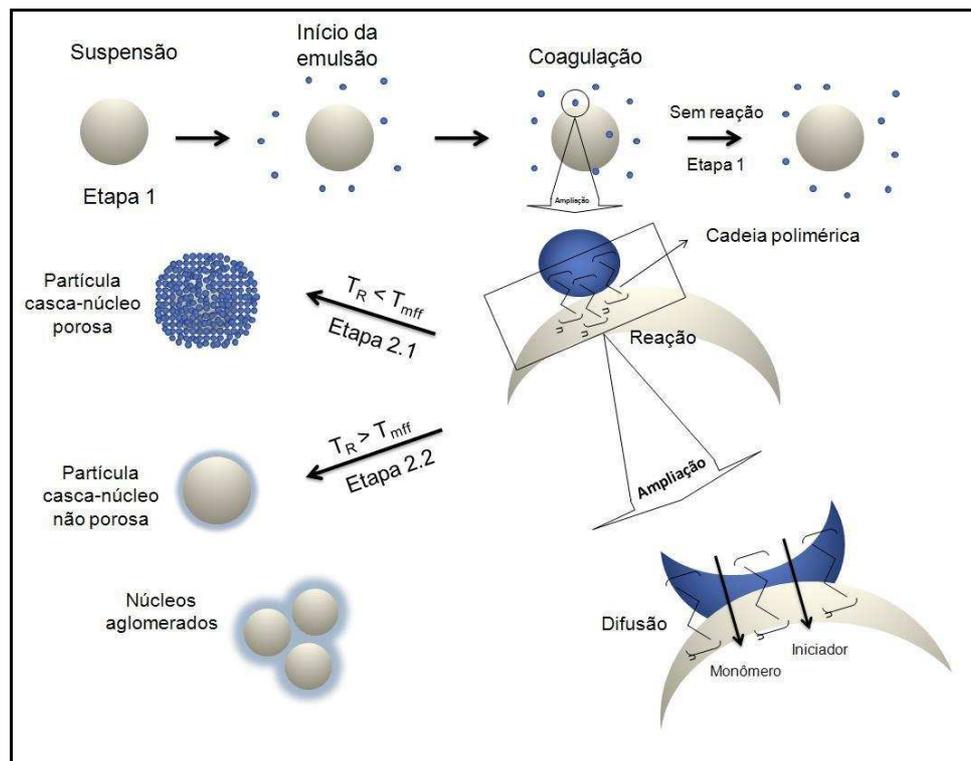


Figura 2.1: Mecanismo de formação de partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo (Retirado de BESTETI, 2009).

2.1.4. Comentários Finais

A utilização de materiais com morfologia casca-núcleo apresenta inúmeras vantagens, por permitirem a combinação de materiais com diferentes propriedades. Em

particular, as partículas com essa morfologia produzidas pela polimerização simultânea em suspensão e emulsão apresentam características bastante peculiares, como a larga distribuição de massas molares e a alta porosidade. Além disso, as composições do núcleo e da casca podem ser facilmente alteradas, possibilitando a criação de uma infinidade de materiais. Diante disso, essas partículas casca-núcleo reúnem diversas características que permitem a sua utilização potencial como suportes para a imobilização de enzimas.

2.2. Imobilização de Enzimas

2.2.1. Processos Enzimáticos

Enzimas estão sendo cada vez mais empregadas em diversas aplicações da indústria química, farmacêutica e de alimentos. A crescente utilização de enzimas deve-se principalmente à elevada especificidade das reações enzimáticas, capaz de gerar conversões elevadas sem a formação de subprodutos. Além disso, observa-se usualmente a redução do número de etapas do processo, além de ser possível o uso de condições operacionais mais brandas, quando comparadas aos processos químicos clássicos. As propriedades catalíticas das enzimas naturais podem ainda ser aperfeiçoadas por meio de modificações na sua estrutura primária, que altera as características químicas, físicas e biológicas do biocatalisador (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 2000; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Uma família de enzimas com crescente aplicação industrial é a família das lipases, classificadas como hidrolases (glicerol éster hidrolases E.C.3.1.1.3). A função biológica das lipases é catalisar a hidrólise de ésteres, principalmente os triacilgliceróis de cadeia longa (contendo dez ou mais carbonos), levando à formação de diacilgliceróis, monoacilgliceróis e gliceróis. A reação inversa também pode ser catalisada pelas lipases, sendo denominadas de esterificação e transesterificação (acidólise, interesterificação e álcoolise), dentre outras (BRINK *et al.*, 1988). O equilíbrio entre as reações de hidrólises e as de esterificação é determinado fundamentalmente pela atividade de água no meio reacional (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

As lipases exibem versatilidade catalítica, são disponíveis comercialmente, podem apresentar químio, estereo e regio seletividade e podem ser usadas em ampla faixa de pH e de temperatura (20-70 °C) (CRESPO *et al.*, 2005).

Além dessas vantagens, a sua função catalítica apresenta características peculiares, uma vez que são enzimas solúveis na água e a maioria das lipases pode ser ativada por uma interface lipídio/água, ocorrendo o aumento da sua atividade catalítica quando a solubilidade do substrato é excedida, o que caracteriza o fenômeno de ativação interfacial (SARDA e DESNUELE, 1958). O comportamento cinético da maioria das lipases está intimamente relacionado às características únicas de sua estrutura tridimensional e à presença de uma tampa, constituída por oligopeptídeos, que se movimenta (ativação interfacial) quando em contato com uma interface, permitindo a exposição do sítio ativo (VILLENEUVE *et al.*, 2000). A função da tampa é encobrir o sítio ativo, formado por um resíduo nucleofílico (serina), um resíduo ácido (glutamato ou aspartato) e um resíduo de histidina. A conformação tampa aberta é alcançada pelas interações eletrostáticas e hidrofóbicas entre a face da enzima de ligação com lipídeos e a interface do meio. Entretanto, algumas lipases não possuem tampa e esse fenômeno de ativação interfacial também pode ser notado (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; BEVILAQUA, 2005). O fenômeno da ativação interfacial dessas enzimas frente a superfícies hidrofóbicas permite o desenvolvimento de lipases hiperativas pelo processo de imobilização. Nessa situação, a lipase reconhece o suporte como uma interface hidrofóbica/hidrofílica (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; BEVILAQUA, 2005). O mecanismo da hiperativação por imobilização em suportes hidrofóbicos está ilustrado na Figura 2.2.

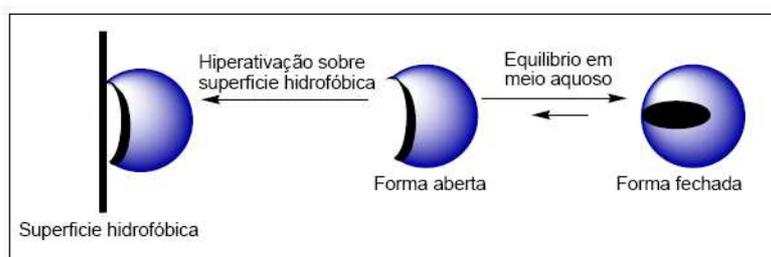


Figura 2.2: Mecanismo da hiperativação de lipases pelo processo de imobilização em superfícies hidrofóbicas (Retirado de CUNHA, 2007).

Atualmente, as lipases respondem por cerca de 5% do mercado mundial de enzimas; entretanto, existe uma forte tendência de crescimento por conta do seu vasto campo de aplicação. Estas enzimas apresentam uma grande versatilidade de propriedades, tais como termoestabilidade, resistência a solventes orgânicos, especificidade, regioseletividade e estereoseletividade, razão pela qual sua participação no mercado mundial de enzimas industriais vem crescendo significativamente (FREIRE e CASTILHO, 2008). Entretanto, um dos desafios encontrados na substituição dos catalisadores químicos pelas lipases na indústria reside no elevado custo de imobilização, custo de produção e dificuldade de separação da enzima solúvel.

2.2.2. Imobilização de Enzimas

Enzimas imobilizadas são aquelas que estão confinadas ou localizadas em um determinado material, com manutenção de sua atividade catalítica, podendo ser reutilizadas repetidamente e continuamente (MOSBACH, 1976). As primeiras enzimas imobilizadas foram preparadas na década de 50, por meio da inclusão dos biocatalisadores em matrizes poliméricas ou fixação sobre suportes (TISCHER e KASCHE, 1999).

A necessidade de imobilização surge por causa da baixa estabilidade e, em algumas situações, da baixa atividade e seletividade das enzimas. A principal razão, no entanto, está associada aos elevados custos de obtenção das enzimas (produção e recuperação), fator que restringe a sua aplicação em grande escala, mesmo que as características de especificidade, região-seletividade e enantio-seletividade sejam adequadas (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Quando imobilizados, os sistemas enzimáticos apresentam inúmeras vantagens, como a facilidade de separação do meio reacional, possibilidade de reutilização, formação de um micro-ambiente ao redor da enzima rico em água e a possibilidade de desenvolver processos contínuos. Na forma imobilizada, diminuem a formação de agregados, os custos operacionais e os riscos de contaminação, o que torna o biocatalisador mais estável e resistente à temperatura e pH e permite aumentar a concentração de enzima no meio reacional (FREIRE *et al.*, 1987; MURRAY *et al.*, 1997; KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 1999; BHUSHAN *et al.*, 2007).

As propriedades finais dos sistemas enzimáticos imobilizados dependem das características do suporte e da enzima. Dessa maneira, em função da interação entre ambos, forma-se um biocatalisador com parâmetros químicos, bioquímicos, mecânicos e cinéticos peculiares, que se refletem no rendimento e eficiência da imobilização e na estabilidade operacional (TISCHER e KASCHE, 1999). A Figura 2.3 ilustra as interações existentes entre as variáveis citadas.

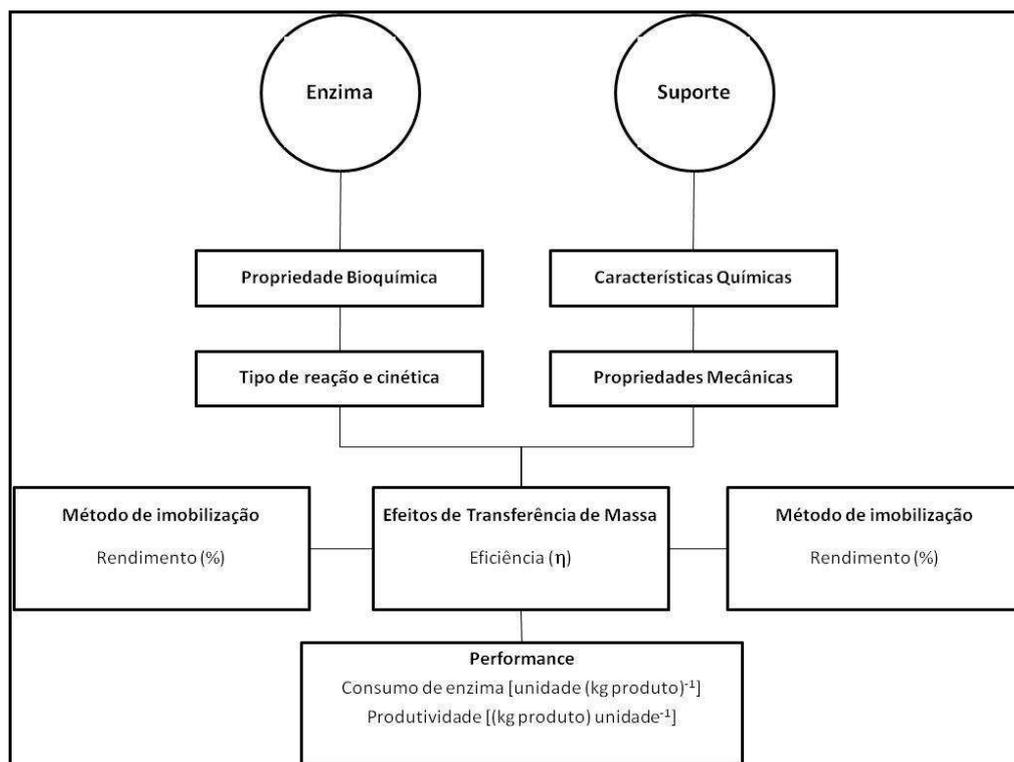


Figura 2.3: Fatores que governam as propriedades finais de uma enzima imobilizada (Adaptado de TISCHER e KASCHE, 1999).

Para tornar seu uso adequado, os suportes usados para a imobilização de enzimas devem apresentar algumas características, como a insolubilidade em água, resistência mecânica, elevada capacidade de imobilizar essas enzimas e deve apresentar custos compatíveis com o processo. Suportes poliméricos, como poli(estireno), poli(acrilatos), poli(acrilamida), celulose e dextrana, são amplamente utilizados para esse fim, com a vantagem de permitirem interações com as enzimas por meio dos grupos funcionais orgânicos. Por outro lado, suportes inorgânicos, como sílica gel, óxido de alumínio, apatita e vidro, têm a vantagem de apresentarem elevada estabilidade mecânica e térmica, serem não-tóxicos e resistentes ao ataque de microorganismos e solventes orgânicos (KAHRAMAN *et al.*, 2007).

Apesar das inúmeras vantagens obtidas com a imobilização, após esse procedimento os biocatalisadores normalmente podem apresentar alguma modificação de sua estabilidade, comportamento cinético e atividade, sendo isso consequência dos seguintes fatores (FREIRE, 1988; SALIS *et al.*, 2003; SALIS *et al.* 2008):

- Efeitos Conformacionais - A interação entre a enzima e o suporte pode ocasionar algumas alterações na disposição espacial dos resíduos de aminoácidos do sítio ativo ou alguma distorção na cadeia protéica.
- Efeitos Estereoquímicos - Em função da interação com o suporte, a enzima pode ter algumas regiões de sua estrutura inacessíveis aos substratos. A natureza hidrofílica ou hidrofóbica do suporte, bem como as propriedades do meio, são fatores que alteram o desempenho da enzima.
- Efeitos de Partição - Surgem pela distribuição desigual de componentes dentro e fora do suporte, dependendo do tipo de interação que ocorra entre o suporte e o substrato.
- Efeitos Difusionais - Como deve ocorrer a migração do substrato do meio reacional para o interior dos poros, onde estão localizadas as enzimas, surgem gradientes de concentração, que modificam as taxas de reação e reduzem a eficiência da enzima imobilizada, quando comparada com a enzima solúvel ou livre. Os gradientes de concentração de substrato são também influenciados pelos efeitos de partição. Os efeitos de difusão interna, relacionados à migração de substrato da superfície do suporte ao domínio da enzima, são muito importantes em materiais porosos, principalmente quando a taxa de reação é alta. Esse efeito pode ser crítico, quando o diâmetro das partículas de suporte aumenta.

2.2.2.1. Metodologias de Imobilização de Enzimas

As técnicas para imobilização de enzimas podem ser classificadas como de imobilização por adsorção, por ligação covalente e por oclusão ou encapsulamento. De acordo com VILLENEUVE *et al.* (2000) e PANZAVOLTA *et al.* (2005), a técnica de imobilização escolhida depende de especificações dos biocatalisadores, como atividade

enzimática, efetividade de reutilização, recuperação das características originais, custos, toxicidade do processo de imobilização e propriedades finais desejadas para a enzima imobilizada. A superfície do suporte e a técnica de imobilização influenciam a atividade do biocatalisador final. A hidrofobicidade, carga e grupos químicos presentes no suporte afetam a estabilidade e orientação da proteína. Por outro lado, o método de imobilização também afeta a atividade enzimática quando causa modificação química dos aminoácidos envolvidos, principalmente se estão próximos ao sítio ativo da enzima (XI *et al.*, 2005).

A) Imobilização por Adsorção Física

A imobilização de enzimas por adsorção física é um método simples e de baixo custo. A interação entre a enzima e o suporte ocorre por meio de forças secundárias, como van der Waals, interação hidrofóbica, ligação de hidrogênio, ligação iônica ou uma combinação dessas. O suporte pode ser reciclado depois que a enzima imobilizada perde totalmente sua atividade. Por causa da simplicidade, este é o método de imobilização mais empregado em larga escala. Os suportes podem ser minerais, materiais inorgânicos (como sílica e alumina), resinas de troca iônica e materiais poliméricos (VILLENEUVE *et al.*, 2000; CUNHA, 2007). A desvantagem principal desse tipo de procedimento reside no fato de as forças eletrostáticas não serem muito intensas. Por isso, as proteínas podem desorver, gerando perda da atividade catalítica do biocatalisador e contaminação do produto final (LATHOUDER *et al.*, 2007).

O sucesso de uma imobilização por adsorção física está relacionado à morfologia e composição química do suporte, concentração de enzima e condições do meio reacional. A morfologia, o tamanho de partícula, a área específica e o diâmetro de poro são as variáveis mais relevantes na escolha do suporte. O tamanho dos poros deve minimizar os efeitos difusionais e permitir que enzimas e substratos consigam ocupar todo o espaço disponível. As interações químicas são muito importantes, influenciando a partição de água, substrato e produto e, conseqüentemente, a atividade enzimática. Porém, uma hidrofobicidade muito elevada pode impedir a entrada da água no interior dos poros, o que pode modificar a capacidade catalítica da enzima. A concentração de enzima a ser empregada deve ser aquela que permite a saturação do suporte. Se a quantidade de enzima empregada for muito baixa, algumas alterações de morfologia

podem ocorrer, reduzindo a atividade catalítica, pois a enzima tende a ocupar o máximo de área disponível. Por outro lado, concentrações excessivas de enzima podem causar problemas denominados de “overcrowding” (durante a imobilização, ocorre a formação de multicamadas de enzimas, o que se traduz em perda de atividade catalítica). O pH também é um fator importante, já que as imobilizações são conduzidas por forças iônicas e costumam ser realizadas em valores de pH próximos ao do ponto isoelétrico da enzima. A adição de solventes durante o processo de imobilização reduz a solubilidade da enzima na fase aquosa e contribui para um aumento na eficiência do procedimento (VILLENEUVE *et al.*, 2000; SALIS *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2004; BLANCO *et al.*, 2007).

O processo de imobilização por adsorção física deve sempre ser cuidadosamente otimizado e pode ser melhorado com a utilização de um suporte com natureza química compatível com as características químicas da enzima. No caso específico das lipases, a melhor estratégia é imobilizar por interação hidrofóbica, em função da elevada concentração de resíduos de aminoácidos com essa característica em sua composição (FERNÁNDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; SALIS *et al.*, 2003; PANZAVOLTA *et al.*, 2005).

B) Imobilização por Ligação Covalente

A imobilização por ligação covalente envolve segmentos de aminoácidos das cadeias laterais da enzima, como lisina, ácido aspártico e glutâmico, tirosina e serina, e grupos específicos do suporte. O suporte pode ser ativado pela incorporação química de grupos capazes de reagir com os segmentos de aminoácidos. Com essa finalidade, são comumente empregados o glutaraldeído, o brometo de cianogêneo e as carbodiimidas. Agentes bifuncionais, que promovem ligações cruzadas entre a enzima e o suporte, são também usados nesse tipo de imobilização. Diversos suportes de composição orgânica e mineral são usados para esse fim.

O glutaraldeído é o agente de ativação e de estabilização mais amplamente empregado. O pequeno tamanho da sua molécula facilita a interação com a proteína. A natureza dessa ligação leva à formação de iminas (base de Schiff) entre os grupos aldeídos do glutaraldeído com os grupos aminas das proteínas (JATURANPINYO *et*

al., 2004). Os obstáculos estéricos existentes entre a superfície do suporte e as moléculas de enzimas podem ser diminuídos com a utilização de moléculas denominadas espaçadores. Essas moléculas devem ter afinidade com suporte e enzima e devem apresentar elevada flexibilidade, para garantir a conformação original da enzima, mantendo-a estável e com bons níveis de atividade (BULMUS *et al.*, 1997; AYAN *et al.*, 2002).

A principal vantagem desse tipo de imobilização é o fato da enzima imobilizada não sofrer qualquer dessorção ao longo do processo reacional. A ligação da enzima com o suporte ocorre de forma bem definida e estável, ao contrário da interação por adsorção física. Entretanto, além da mudança conformacional, que pode resultar em perda parcial da atividade, a ligação deve ocorrer com segmentos de aminoácidos não envolvidos com a função catalítica, o que nem sempre acontece, tornando o método de imobilização bastante empírico. A imobilização pode ocorrer apenas nas áreas externas do suporte, tornando a morfologia do suporte uma variável de menor importância (FERNANDEZ-LAFUENTE, 1998; VILLENEUVE *et al.*, 2000; HASIRCI *et al.*, 2006).

A estabilidade de enzimas imobilizadas covalentemente pode ser melhorada por meio da formação de ligações multipontuais entre a enzima e o suporte. A morfologia interna do suporte pode ser importante para o estabelecimento desse tipo de ligação, uma vez que superfícies amplas facilitam o estabelecimento de interações entre a proteína e o suporte (MATEO *et al.*, 2006).

C) Imobilização por Oclusão/Encapsulamento

Nesse tipo de procedimento de imobilização ocorre o aprisionamento da proteína em géis, fibras, membranas ou matrizes poliméricas. Dessa forma, a liberação da proteína para a solução fica impedida, porém a difusão dos substratos e produtos é permitida. A imobilização por oclusão ou encapsulação apresenta a grande desvantagem de aumentar os efeitos de difusão, restringindo o acesso de moléculas de determinados tamanhos ao centro ativo enzimático. A vantagem reside no fato de que a interação com o suporte é minimizada; dessa forma, consegue-se conservar a atividade catalítica original da enzima (FREIRE, 1988; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

2.2.3. Suportes utilizados na Imobilização de Enzimas

Um dos primeiros suportes utilizados para a imobilização de enzimas foi o Eupergit[®] C, que é constituído por diversos metacrilatos e possui em sua estrutura uma grande quantidade de grupos oxiranos (óxido de etileno), que realizam ligações covalentes multipontuais com alguns resíduos de aminoácidos das proteínas. Trata-se de um material com ampla versatilidade de aplicação e boas propriedades mecânicas (KATCHALSKI-KATZIR e KRAEMER, 1999).

O suporte de polipropileno ou polietileno poroso, disponível comercialmente com o nome de Accurel[®], tem sido muito empregado em imobilizações por adsorção física, em função de seu caráter hidrofóbico. Para o caso específico de lipases, pode causar o aumento da sua atividade catalítica e enantio-seletividade, em função da elevada afinidade da enzima com a sua estrutura química (SALIS *et al.*, 2003; ALMEIDA *et al.*, 2008). Segundo OLIVEIRA *et al.* (2006), a afinidade entre lipase de *Yarrowia lipolytica* e o Accurel[®] permitiu a produção de biocatalisadores estáveis, quando empregados em bioprocessos com fluidos comprimidos e supercríticos. Trata-se de um material bastante homogêneo, permitindo que as enzimas se depositem de forma igual e sem grandes modificações em sua estrutura. Apresenta valores de área específica bastante consideráveis (por exemplo, o Accurel[®] EP100, tem área específica de 45 m²/g) e poros com ampla faixa de tamanhos (variam de 9 a 25 µm) (AL-DURI e YONG, 2000; SABBANI *et al.*, 2006). Segundo SABBANI *et al.* (2006), no caso da imobilização de lipases de *Candida rugosa* e avaliando a atividade de esterificação enantio-seletiva, os tipos de Accurel[®] com menores tamanhos de partículas permitem produzir biocatalisadores mais eficientes, pois resultam em maiores áreas específicas disponíveis para a adsorção.

O poli(estireno) é um material polimérico que também vem sendo empregado para o desenvolvimento de suportes poliméricos, principalmente pelas suas características intrínsecas de elevada hidrofobicidade, capaz de gerar interações intensas com as enzimas, principalmente lipases. Além disso, o poli(estireno) apresenta boas propriedades de resistência mecânica. Entretanto, essa elevada hidrofobicidade pode causar modificações na estrutura da enzima e impedir o acesso do substrato, gerando um

biocatalisador com baixa atividade, como observou MURRAY *et al.* (1997) na imobilização de lipase de *Candida rugosa* em um látex não poroso de poli(estireno).

Existem materiais à base de poli(estireno-co-divinilbenzeno) disponíveis comercialmente (Amberlite e Amberchrom) que possuem área específica bastante elevada (variando na faixa de 200-700 m²/g) e diâmetro médio de poro na faixa de 300-1000 Å (CHEN *et al.*, 2007a). Na imobilização de lipase B de *Candida antarctica*, com diferentes tipos desses suportes, as melhores atividades enzimáticas foram encontradas nos materiais que exibiam menores tamanho de partícula e diâmetro médio de poro, devido à intensa interação com o material, as lipases não penetravam no interior dos poros, gerando um maior recobrimento superficial das partículas (CHEN *et al.*, 2007a).

Da mesma forma que o poli(estireno), o uso de poliacrilatos é crescente em aplicações para a imobilização de enzimas. Esses compostos não exibem elevada hidrofobicidade; contudo, são capazes de promover funcionalização de forma simples, possibilitando a sua aplicação tanto em imobilizações por adsorção física quanto por ligação química (LI *et al.*, 2004).

O poli(metacrilato de metila) e derivados são comumente funcionalizados com grupos aldeídos, para serem empregados em imobilizações por ligações covalentes (BULMUS *et al.*, 1997; AYHAN *et al.*, 2002; LI *et al.*, 2004). Blendas de poli(metacrilato de metila) e de poli(estireno) foram estudadas por LI *et al.* (2006) na imobilização de albumina, a fim de comparar o efeito de interação polares e apolares. Inicialmente, a proteína tende a se depositar na região limite entre os dois polímeros, em função da competição entre interações polares e não-polares. O fenômeno de adsorção física apresentou natureza estocástica. Em seguida, as enzimas tendem a interagir com o poli(estireno) e somente depois ocupar os sítios de poli(metacrilato de metila), indicando que as interações hidrofóbicas tendem a predominar durante a imobilização (LI *et al.*, 2006).

Suportes de poli(metacrilato de metila) também são comercializados como tipos de Amberlite e Amberchrom. Estão disponíveis em ampla faixa de tamanhos de partículas e com área específica de 500 m²/g e diâmetro médio de poro de 250 Å. CHEN *et al.* (2007b) estudaram a influência de suas características morfológicas na

imobilização de lipase B de *Candida antarctica*. Quanto menor o tamanho das partículas, mais rapidamente ocorre a saturação do suporte e mais uniforme é a distribuição da lipase na superfície do material, não havendo regiões inativas (CHEN *et al.*, 2007b).

Sepabeads® é um tipo comercial de suporte à base de poli(metacrilato de metila) e que pode receber diversas funcionalizações, como grupos epóxi, amino-epóxi e octadecil. Trata-se de um material com boas propriedades mecânicas e químicas, poros largos e área específica elevada (GUISÁN *et al.*, 2001). Particularmente, o suporte Octadecil-Sepabeads é caracterizado pela elevada hidrofobicidade, resultante da extensa cadeia lateral contendo 18 átomos de carbono. De acordo com PALOMO *et al.* (2002a) e CUNHA *et al.* (2009), essa distinta característica o torna muito útil quando utilizado na imobilização de lipases, pois causa o fenômeno da hiperativação interfacial de sua superfície, fazendo com que ela reconheça a superfície do suporte como se fossem moléculas de substrato, o que facilita o acesso ao seu sítio ativo. Além disso, a estrutura química do octadecil, com longas cadeias laterais, facilita a acomodação da lipase durante a imobilização. Em alguns casos, esse efeito pode causar o aumento da atividade catalítica, em comparação com a enzima em solução.

Suportes contendo grupos epóxi são uma boa alternativa para a imobilização de enzimas, em função de sua boa estabilidade em pH neutro. Esses materiais podem reagir com diferentes grupos nucleofílicos (como amino, hidroxila e tiol), formando ligações covalentes com pequena modificação da proteína. Os grupos epóxi reagem com segmentos de aminoácidos específicos, em função do pH do meio reacional. (MATEO *et al.*, 2000; GHAZI *et al.*, 2005; BAI *et al.*, 2006).

Imobilizações de penicilina G acilase de *Escherichia coli*, através de grupos epóxi, foram estudadas por KOTHA *et al.* (1996), em suportes à base de metacrilato e divinilbenzeno. Constatou-se que o aumento da quantidade de divinilbenzeno produzia partículas com faixa de tamanhos maiores e aumentava a concentração de enzima imobilizada. Porém, uma concentração muito elevada de divinilbenzeno gera interações hidrofóbicas mais intensas entre a enzima e a matriz polimérica, o que faz a sua atividade catalítica decair (KOTHA *et al.*, 1996). Polímeros de composição semelhante foram empregados por BAI *et al.* (2006) na imobilização glucoamilase de *Aspergillus*

niger. À medida que a quantidade de agente reticulante aumentava, a área específica também aumentava (58,2-135,3 m²/g), causando, entretanto, a redução no volume de poro, da concentração de grupos epóxi e, conseqüentemente, da quantidade de enzima que pode ser imobilizada. A influência do aumento na área específica por adição de agente reticulante também foi observada por BHUSHAN *et al.* (2007).

MATEO *et al.* (2003) compararam os parâmetros de imobilizações em suportes ativadas apenas com grupos epóxi (Sepabeads[®] EC-EP1, EC-EP2 e EC-EP3) e com grupos epóxi-amino (Sepabeads[®] EC-HFA). As enzimas utilizadas foram β -galactosidase de *Aspergillus oryzae* e de *Thermus* sp., lipase de *Candida rugosa*, invertase de levedura do pão, glucoamilase de *Aspergillus niger* e glutaril acilase. Para todas essas proteínas a retenção de atividade, na faixa de 65-100%, foi maior para os suportes com grupamentos epóxi-amino. Nesse material ocorre primeiramente a adsorção iônica por meio das regiões negativamente carregadas da proteína e, em seguida, a formação de ligações covalentes multipontuais. No suporte que contém apenas grupos epóxi, a interação ocorre por meio das partes hidrofóbicas e a ausência de multifuncionalidade torna a taxa de formação da ligação covalente mais lenta. GHAZI *et al.* (2005) também utilizou diferentes tipos de Sepabeads[®] para a imobilização de frutossiltransferase de *Aspergillus aculeatus* e as melhores atividades enzimáticas foram encontradas nos materiais com maiores tamanhos de poros.

CHEN *et al.* (2008) exploraram a imobilização lipase de *Candida antarctica* em um suporte ativado com grupos epóxi, comercialmente disponível como Amberzyme (área específica de 230 m²/g e diâmetro médio de poro de 230 Å). Outros suportes foram também empregados, para fins de comparação: nanopartículas com estrutura casca-núcleo (com casca de poli(glicidil metacrilato) e núcleo de poli(estireno)), que podem reagir com a enzima por meio dos grupamentos epóxi, e a resina Lewatit VP OC 1600 (área específica de 130 m²/g e diâmetro médio de poro de 150 Å), constituída de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) e usada para a produção da lipase comercializada com o nome de Novozyme 435. A análise da distribuição da lipase por microespectroscopia em Amberzyme e Lewatit VP OC 1600 indicou que as proteínas tendem a se aglomerar pela elevada afinidade na superfície do suporte, enquanto que no interior dos poros a interação entre elas é fraca e até repulsiva. As lipases imobilizadas

em nanopartículas exibiram a maior atividade, apesar dessas partículas não serem porosas, em virtude de seu pequeno tamanho, que praticamente elimina os efeitos difusionais. A menor atividade foi observada para Amberzyme, como consequência da orientação da enzima imobilizada, que pode causar sua desnaturação (CHEN *et al.*, 2008).

Dillbeads[™] é um tipo comercial de suporte enzimático obtido a partir de uma combinação de quatro tipos de acrilatos, agente reticulante e agentes formadores de poros com grupos epóxi. As áreas específicas variam de 67-311 m²/g e o diâmetro médio de poro fica na faixa de 27-100 nm. O seu desempenho foi avaliado na imobilização de esterase de *Ophiostoma piceae*, constatando-se que, quanto maior o diâmetro de poro, maior é a quantidade de enzima que se liga ao suporte (TORRES *et al.*, 2008).

Polímeros naturais são exemplos clássicos de suportes usados para a imobilização de enzimas, como a agarose, celulose, quitina, quitosana e Sepharose, à base de dextrana. Esses materiais têm boa compatibilidade e podem ser funcionalizados, porém apresentam baixa resistência aos procedimentos operacionais e à pressão e a estrutura macroporosa pode facilitar a dessorção da proteína (FREIRE *et al.*, 1987; XI *et al.*, 2005; ÇETINUS *et al.*, 2007).

Resinas de troca iônica são materiais produzidos pela deposição de polímeros sintéticos sobre polímeros naturais, principalmente agarose e Sepharose. Dessa forma, o polímero é capaz de envolver a superfície disponível, aumentar a concentração de cargas, criar uma estrutura flexível e melhorar as propriedades de adsorção. A possibilidade de aplicação dessas resinas está relacionada à presença de cargas elétricas na superfície protéica, que interagem com cargas localizadas na superfície de materiais poliméricos por meio de forças de Coulomb de longo alcance (ATIA, 2005). Comumente, poli(etileno imina) e aspártico-dextrana são covalentemente ligados aos suportes (PALOMO *et al.*, 2002a; FUENTES *et al.*, 2004a; FUENTES *et al.*, 2004b; CUNHA, 2007).

As diversas conformações que a estrutura de uma lipase de *Candida rugosa* com tampa pode sofrer, em função das características do suporte, foi analisada por

PALOMO *et al.* (2002b). O suporte de glioxil-agarose consegue provocar na enzima o fenômeno de ativação interfacial, que gera uma eficiência de imobilização de 100% e total retenção de atividade. O suporte de poli(etilenoimina)-Sepabeads é uma resina de troca iônica; portanto, a imobilização ocorre por adsorção iônica e exibe 10% de decréscimo de atividade. Gluteraldeído-Sepabeads realiza ligações covalentes com a proteína e a sua atividade chega a decrescer em até 20%. Esses valores de atividade catalítica estão intimamente relacionados com a conformação adquirida pela lipase, em função da imobilização. Como consequência, para diferentes substratos há diferentes afinidades pelo biocatalisador e até mudança de enantio-seletividade (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2001). Esse tipo de suportação também permite que a lipase fique protegida da ação de solventes, impedindo que ocorram efeitos deletérios, pois a parte hidrofóbica da enzima está voltada para o suporte hidrofóbico, surgindo ao redor um ambiente hidrofílico (GUISÁN *et al.*, 2001; ABIAN *et al.*, 2002, CUNHA *et al.*, 2009).

PALOMO *et al.* (2004) propuseram diversas estratégias de imobilização para a lipase de *Bacillus thermocatenuatus*. Os suportes escolhidos foram: octadecil-Sepabeads, PEI-agarose, DEAE-agarose e glioxil-agarose para a formação de ligação covalente multipontual. O suporte octadecil-Sepabeads exibiu os melhores resultados, com retenção de 100% de atividade e aumento na atividade de hidrólise. Esse resultado foi devido à ativação interfacial sofrida pela lipase, quando em contato com a superfície extremamente hidrofóbica. O suporte de glioxil-agarose apresentou um decréscimo de atividade de 30%, seguido de PEI-agarose e DEAE-agarose, que foi de 10%.

A influência do fenômeno de ativação interfacial, decorrente da imobilização por adsorção hidrofóbica, foi verificada por FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.* (2007). Para tanto, a enantio-seletividade de lipases de *Candida rugosa* e *Alcaligenes* sp. foi analisada e comparada em função da técnica de imobilização empregada. Como suporte hidrofóbico, foi usado octil-agarose; como suporte para ligação covalente, utilizou-se CNBr-Sepharose 4B. Para ambas as enzimas, em função dos segmentos de aminoácidos hidrofóbicos localizados ao redor do sítio ativo e do ambiente hidrofóbico gerado pelo suporte, octil-agarose sempre mostrou os melhores resultados.

Suportes à base de aminopolímeros são muito comuns na imobilização de enzimas e também podem receber diversas funcionalizações (BALTIERI *et al.*, 2002;

HASIRCI *et al.* (2006). As poli(cetonas) também podem funcionar como suportes para enzimas, uma vez que a presença de grupos carbonilas permite a formação de pontes de hidrogênio com os segmentos de aminoácidos da cadeia peptídica (AGOSTINELLI *et al.*, 2007). Poli(óxido de etileno) também pode ser empregado para esse fim (CRESPO *et al.*, 2005).

PANZAVOLTA *et al.* (2005) desenvolveram um suporte constituído por poli(fenil acetileno) (área específica de 44 m²/g e diâmetro de poro na faixa de 100 a 200 Å) e compararam o seu desempenho na imobilização de lipase de *Candida rugosa* com o de outros materiais, como Accurel EP 100 (área específica de 90 m²/g e diâmetro médio de poro de cerca de 250 Å), poli(álcool vinílico) reticulado e funcionalizado com cadeias C₁₂ (área específica de 0,86 m²/g e diâmetro médio de poro de cerca de 1000 Å) e resina de poliacrilato funcionalizada com cadeias C₁₈ (Octadecil-Sepabeads) (área específica de 900 m²/g e diâmetro médio de poro na faixa de 50-60 Å). Esse último suporte foi tratado com poli(etilenoimina), uma substância polar que mantém a conformação ativa da enzima. Com exceção do poli(fenil acetileno), todos os outros materiais exibem cadeias laterais extensas, que realizam interações hidrofóbicas com as enzimas. O suporte a base de poli(fenil acetileno) conservou 30% da atividade catalítica, em comparação com a enzima em solução, pois interage principalmente com aminoácidos aromáticos, presentes próximos ao sítio ativo, enquanto que os outros materiais conservam cerca de 60% da atividade enzimática inicial.

YANG *et al.* (2006) determinaram a influência das características morfológicas e de polaridade de diferentes suportes na imobilização de lipase de *Candida sp.*, em uma reação de hidrólise. Os suportes utilizados foram NKA-9 (polar, área específica de 250-290 m²/g e diâmetro médio de poro na faixa de 15,5-16,5 nm), AB-8 (fracamente polar, área específica de 480-520 m²/g e diâmetro médio de poro na faixa de 13-14 nm), H103 (não polar, área específica de 1000-1100 m²/g e diâmetro médio de poro na faixa de 8,5-9,5 nm), D4020 (não polar, área específica de 540-580 m²/g e diâmetro médio de poro na faixa de 10-10,5 nm) e NKA (não polar, área específica de 570-590 m²/g e diâmetro médio de poro na faixa de 20-22 nm). Os melhores resultados de atividade de hidrólise foram exibidos para suportes com área específica de 580 m²/g, com poros maiores. A característica de apolaridade permite uma maior interação com o substrato (apolar) e a

morfologia adequada facilita a entrada deste substrato e a saída do produto, minimizando os efeitos difusionais.

Polímeros com estrutura casca-núcleo também podem ser usados para a imobilização de enzimas, com a vantagem de combinarem as propriedades distintas dos constituintes do núcleo e da casca (UCHIDA *et al.*, 2001; JATURANPINYO *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2006).

FIGUEIREDO *et al.* (2005) analisaram os efeitos da concentração inicial de enzima e da solução de tampão e do pH na adsorção de lisozima em diferentes materiais, como hidroxiapatita, poli(estireno) casca-núcleo (com casca porosa e obtido por meio da combinação de polimerização em suspensão e emulsão, segundo metodologia proposta por LENZI *et al.* (2003) e de Amberlit IRA 120, constituído de poli(estireno-co-divinilbenzeno). A maior quantidade de enzima foi adsorvida em hidroxiapatita, sendo dependente de todas as variáveis analisadas, que foram concentração de enzima e da solução tampão de fosfato e o pH. O desempenho do poli(estireno) casca-núcleo também foi considerado satisfatório. A quantidade de enzima adsorvida nesse caso foi independente a concentração de tampão e, diferentemente da hidroxiapatita, a interação com a enzima não era governada por forças eletrostáticas. Os resultados com Amberlite IRA 120 não foram conclusivos, uma vez que as variâncias experimentais exibiram valores muito elevados.

Diversos outros materiais poliméricos podem ser usados como suportes enzimáticos. Outros exemplos incluem polímeros com grupos azalactona (HEILMANN *et al.*, 2004), poli(álcool vinílico) e criogel (PLIEVA *et al.*, 2000), poli(óxido de fenileno) funcionalizado com grupos aminas (GANCARZ *et al.*, 2006), poli(carbonato de vinilideno) e poli(óxido de etileno) coberto com grupos amina (DING e QU, 2001), polímeros condutores (BIEGUNSKI *et al.*, 2006) e polímeros magnéticos (BAYRAMOGLU *et al.*, 2007)

Como detalhado anteriormente, a grande vantagem do uso de materiais inorgânicos frente aos poliméricos, naturais ou sintéticos, está na sua elevada resistência mecânica e química. Um bom exemplo são as zeólitas, (diâmetro médio de partícula de 3,2 μm , área específica de 790 m^2/g e diâmetro médio de poro de 1,6 nm), constituído

por minerais de alumínio e sílica, altamente porosas e hidrofóbicas, sendo comum o uso na imobilização de lipases (KNEZEVIC *et al.*, 1998; MOJOVIC *et al.*, 1998).

Celite é um material constituído por partículas porosas de diatomáceas, composto por óxido de sílica e alguns outros compostos inorgânicos. Apresenta uma estrutura com poros conectados, além de ser inerte, resistente a meios orgânicos, biocompatível e de baixo custo. Geralmente a Celite não é funcionalizada. Dessa forma, a imobilização por adsorção física costuma ser preferida (IVANOV e SCHNEIDER, 1997; KHARE e NAKAJIMA, 2000; CHANG *et al.*, 2007).

A influência do diâmetro de poro de suportes para imobilização de enzimas também foi investigado por KANG *et al.* (2007), usando sílicas mesoporosas com grande quantidade de grupos silanol na sua superfície, denominadas de SBA-15. A forma funcionalizada com grupos diisopropil, introduzidos com o objetivo de aumentar a interação com a enzima, é denominada de DIP-SBA-15. Ambos apresentavam partículas com tamanho médio de 2 μm e diâmetro de poro de 6, 8 e 13 nm, sendo indicados por SBA (6) (área específica de 546 m^2/g), SBA (8) (área específica de 623 m^2/g), SBA (13) (área específica de 721 m^2/g), DIP-SBA (6) (área específica de 520 m^2/g), DIP-SBA (8) (área específica de 592 m^2/g) e DIP-SBA (13) (área específica de 700 m^2/g). A enzima utilizada no processo de imobilização foi a lipase de pâncreas de porco e os parâmetros de imobilização foram avaliados em função da atividade de hidrólise de triacetina. A eficiência de imobilização e retenção de atividade foram melhores para os suportes com diâmetro de poro na ordem de 8 nm. Como o diâmetro médio da lipase pancreática está em torno de 4,8 nm, a difusão em poros com 6 nm fica dificultada, enquanto que no suporte com 13 nm de diâmetro de poro essa dificuldade fica minimizada. Porém, o excesso de espaço disponível facilita a dessorção da proteína. O suporte DIP-SBA tem melhor desempenho em comparação ao SBA, pois a sua superfície mais hidrofóbica permite que ocorra o fenômeno de hiperativação interfacial da lipase, melhorando a interação com o suporte (KANG *et al.*, 2007).

Diversos outros materiais inorgânicos também foram estudados na imobilização de diferentes enzimas, como sílica e alginato (CORADIN e LIVAGE, 2003), silicato de sódio (MATSUMOTO e OHASHI, 2003), sílica gel coberta com quitosana (XI *et al.*, 2005; WU *et al.*, 2006), sílica funcionalizado com grupos octil (BLANCO *et al.*, 2007),

carbonato de cálcio (GHAMGUI *et al.*, 2007), carboximetilcelulose (DALLA-VECCHIA *et al.*, 2005), partículas de vidro funcionlizadas (KAHRAMAN *et al.*, 2007)

2.2.4. Comentários Finais

Diante do que foi exposto, pode-se concluir que é ampla a faixa de materiais que podem ser utilizados para a imobilização de enzimas, tanto por adsorção física, quanto ligação covalente e encapsulamento. A principal característica desses suportes, que influenciam em maior proporção a interação com a enzima e manutenção de sua atividade catalítica em níveis aceitáveis, é a sua estrutura química e as suas características morfológicas, como área específica e diâmetro médio de poro. Pode-se notar que muitos dos materiais apresentados precisam passar por etapas de funcionalização, a partir de uma matriz inicial, com o objetivo de introduzir os grupos funcionais adequados para a aplicação final. Suportes que permitam a adaptação de sua composição ao caráter químico dos segmentos de aminoácidos suportados podem apresentar vantagens de utilização em processos enzimáticos. Nesse sentido, os polímeros casca-núcleo, oriundos da polimerização simultânea em suspensão e emulsão, podem constituir uma boa alternativa para produção de suportes, pois as composições do núcleo e da casca podem ser facilmente alteradas para se adequarem às características da estrutura enzimática (engenharia de suportes). Esses suportes podem ser particularmente úteis para a imobilização de lipases (e CAL-B) porque essas enzimas são suportadas eficientemente por interações hidrofóbicas, por meio de adsorção física. Além disso, nesse caso essas enzimas são mantidas numa forma favorável à reação.

CAPÍTULO 3

Materiais e Métodos I: Reações de Polimerização

O objetivo do presente capítulo é descrever o sistema empregado para conduzir as reações de polimerização em suspensão e emulsão, para a formação de partículas com morfologia casca-núcleo, empregadas como suportes para a imobilização de enzimas. As reações de saponificação, usadas para a funcionalização de alguns polímeros, também são descritas. Os procedimentos experimentais, materiais utilizados e as técnicas de caracterização empregadas também são detalhados na seqüência.

3.1. Unidade Experimental

O esquema da unidade experimental empregada para realizar as reações de polimerização está ilustrado na Figura 3.1.

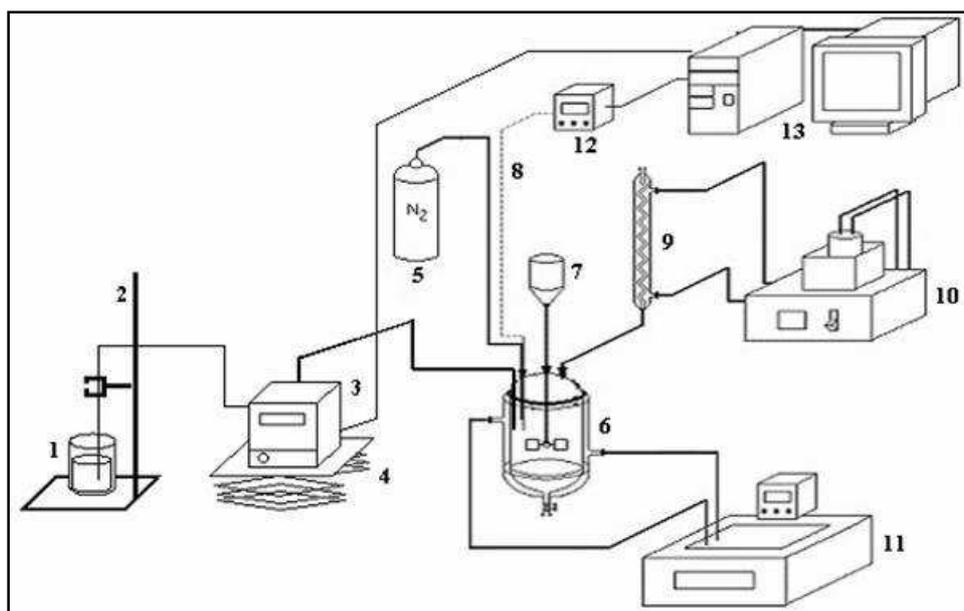


Figura 3.1: Esquema da unidade experimental.

A unidade experimental é constituída por:

1. Frasco de alimentação, consistindo de um béquer com capacidade de 150 ml, devidamente vedado. A alimentação é constituída apenas por monômero;
2. Suporte com garra para segurar a corrente de alimentação;
3. Bomba dosadora (Prominent, modelo GALA1000SST200UA002100) com cabeça de bombeamento de aço inox;
4. Suporte para a bomba;
5. Reator de vidro borossilicato encamisado e com capacidade de 1,0 l (FGG Equipamentos Científicos LTDA). A tampa do reator é de aço inox e possui orifícios para a alimentação de monômero e de N₂, alocação de termopar, introdução do agitador e do condensador de refluxo. Uma braçadeira de aço é utilizada para fixar a tampa junto ao reator. Um anel de viton é colocado entre o reator e tampa, a fim de impedir vazamentos (PEIXOTO, 2007);
6. Agitador mecânico de aço inox (Ika, modelo Eurostar Power Control), com haste reta e impelidor do tipo hélice de seis pás verticais (ângulo entre as pás de 45°);
7. Condensador de refluxo com serpentina, usado para recuperar o monômero volatilizado ou arrastado com N₂;
8. Banho de resfriamento (Nova Ética, modelo 521/20), cujo fluido de circulação é água destilada;
9. Banho de aquecimento com temperatura programada (Haake, modelo C25P), com fluido de circulação constituído por água destilada e etileno glicol (proporção de 1:1);

3.2. Reagentes

Todos os reagentes empregados não passaram por qualquer purificação prévia, sendo usados diretamente como recebidos do fabricante, com exceção da água empregada na reação de saponificação.

1. Estireno (ES), fornecido pela Nitriflex Resinas S/A com pureza mínima de 99%, sendo usado como monômero nas reações de polimerização em suspensão e emulsão;
2. Acetato de vinila (VAc), fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%, sendo usado como monômero nas reações de polimerização em emulsão;

3. Metacrilato de metila (MMA), fornecido pela Aldrich com pureza mínima de 99,5%, sendo usado como monômero nas reações de polimerização em suspensão e emulsão;
4. Benzoato de Vinila (BV), fornecido pela Aldrich com pureza mínima de 99%, sendo usado como monômero nas reações de polimerização em emulsão;
5. Divinilbenzeno (DVB), fornecido pela Aldrich com pureza mínima de 99%, sendo usado com agente reticulante nas reações de polimerização em suspensão e em emulsão;
6. Peróxido de benzoíla (BPO), fornecido pela Vetec com 97% de pureza, sendo usado como iniciador na polimerização em suspensão;
7. Persulfato de Potássio ($K_2S_2O_8$), fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%, sendo usado como iniciador na polimerização em emulsão;
8. Lauril sulfato de sódio (SLS), fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 90%, sendo usado como emulsificante da polimerização em emulsão;
9. Bicarbonato de sódio ($NaHCO_3$), fornecido pela Proquimios com 99,70% de pureza, sendo usado como tampão na polimerização em emulsão;
10. Poli(álcool vinílico) (PVA), fornecido pela Vetec Química Fina com 98% de pureza, grau de hidrólise de 88% e Mw de 78.000 g/mol, sendo usado como agente de suspensão da polimerização em suspensão;
11. Hidróxido de sódio, fornecido pela Vetec Química Fina com 99% de pureza, usado na reação de saponificação;
12. Tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro, fornecido pela Tedia Company Inc. com pureza mínima de 99,90%, usado na análise de GPC como fase móvel e na solubilização das amostras;
13. Hidroquinona, fornecida pela Vetec Química Fina com 99% de pureza, sendo usada como inibidor da reação de polimerização quando adicionada às alíquotas retiradas durante reação.
14. Ciclohexano, fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%, sendo usado nas análises de picnometria;
15. Água destilada, usada no preparo das soluções de PVA, $K_2S_2O_8$, SLS e $NaHCO_3$. Também é empregada como fluido de troca térmica e na lavagem do polímero durante a filtração;
16. Água filtrada e desmineralizada, usada no preparo da solução de NaOH e empregada na reação de saponificação;

17. Etileno glicol, fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%, empregado como fluido de troca térmica no banho de resfriamento;

18. Nitrogênio líquido, fornecido pela White Martins com pureza mínima de 99%, usado na análise de BET e na etapa de filtração.

3.3. Materiais e Equipamentos

Os materiais e equipamentos empregados durante as reações de polimerização, na etapa de purificação e na caracterização das amostras produzidas são descritos a seguir.

1. Placa de agitação (IKA C-MAG HS 7) para homogeneização das soluções empregadas;
2. Balanças (Gehaka, modelo BG-400, pesagem máxima de 404 g; Belmark, modelo U210A, pesagem máxima de 210 g), com precisão de 0.001 g, para pesagens dos componentes das polimerizações e das amostras para análise;
3. Papel de filtro (Qualy, gramatura 80, poros com diâmetro médio de 14 μm), utilizado na etapa de filtração;
4. Dewers e trape para a etapa de filtração;
5. Bomba de vácuo (Quimis, modelo Q35SD2) para a etapa de filtração;
6. Estufa de circulação (Quimis, modelo Q314) para a secagem das alíquotas de conversão;
7. Estufa a vácuo (Precision, modelo 29) para a secagem das amostras;
8. Microscópio ótico binocular (Nikon, modelo SMZ800, com capacidade de ampliação de 50 \times), com câmera digital (Nikon Coolpix 995) acoplada que permitia a ampliação e digitalização da imagem, empregado para visualizar a morfologia das partículas obtidas;
9. Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) (Fei Company, modelo Quanta 200), com tensão máxima de 30 kV, em alto vácuo e em SE (elétrons secundários). As fotomicrografias foram processadas em um analisador de imagens (Fei Company). As amostras eram metalizadas no metalizador JFC 1500 (Jeol LTDA);
10. Microscópio Eletrônico de Varredura por Emissão de Campo (FEG-MEV) (Fei Company, modelo Quanta 400, com tensão máxima de 30 kV e resolução nominal de

1,2 nm, em alto vácuo em elétrons secundários). As fotomicrografias foram processadas em um analisador de imagens (Fei Company). As amostras eram metalizadas no metalizador

11. Cromatógrafo (Viscotek, modelo VE 2001 GPC Solvent/Sample Module, com quatro colunas Phenomenex, com géis de porosidade 10^3 , 10^5 e 10^6 Å, e detector refratométrico Viscotek, modelo VE 3580) para a determinação da distribuição de massas molares das partículas presentes no sobrenadante de cada polimerização. A calibração do equipamento foi feita com padrões de poli(estireno), com massas molares na faixa de 2340 – $1,86 \times 10^6$ Da;

12. Calorímetro (Perkin Elmer, modelo DSC7) para a determinação da temperatura de transição vítrea (T_g) das partículas produzidas;

13. Analisador de área específica, diâmetro médio de poro e volume de poro pelo método BET (Micrometics, modelo ASAP 2000). As análises eram conduzidas variando-se a temperatura de 0 a 60 °C, admitindo que o nitrogênio adsorvido na amostra segue uma isoterma padrão de referência;

14. Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instrumentos, modelo Mastersize 2000), usado a determinação da distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo;

15. Analisador de tamanho de partícula (Malvern Instruments Zeta Size-Nano, modelo Nano-ZS), usado para a determinação da distribuição de tamanhos de partículas presentes no sobrenadante de cada polimerização;

16. Particle Size Distribution Analyser (PSDA), versão 1.0, software para determinação da distribuição de tamanhos de partícula das partículas resultantes da polimerização em suspensão, patenteado por SOARES e PINTO (2006);

17. Tensiômetro (Kruss Process, modelo K100) para a determinação do ângulo de contato das partículas casca-núcleo.

18. Espectrômetro (Thermo Fisher Scientific Inc., modelo Nicolet 6700), com detector MCT/B Smart Orbit, resolução 4 e 128 varreduras (64 varreduras de fundo).

3.4. Procedimento Experimental

Nesta seção, são descritos os procedimentos experimentais usados nas reações de polimerização em suspensão, em emulsão e na reação de saponificação.

3.4.1. Reações de Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão

As reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão, para a obtenção de partículas com morfologia casca-núcleo, foram realizadas com base em uma metodologia estabelecida, descrita na literatura e patenteada (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003; PINTO *et al.*, 2004a; BESTETI, 2009). As quantidades de reagentes, condições e procedimentos experimentais empregados são detalhados a seguir. Foi dada ênfase à variação da composição do meio reacional, avaliando-se a influência das propriedades dos monômeros utilizados sobre as características dos materiais obtidos.

3.4.1.1. Reação de Polimerização em Suspensão

A polimerização simultânea em suspensão e emulsão permite a obtenção de partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo, sendo que a etapa de polimerização em suspensão é responsável pela formação do núcleo e a reação de polimerização em emulsão forma as nanopartículas que constituem a casca. A duração da etapa de suspensão influencia diretamente a capacidade do núcleo em capturar as partículas oriundas da reação em emulsão. Como detalhado no trabalho de LENZI (2002), reações em suspensão de estireno com duração de 2h a 85 °C (correspondente à uma conversão de cerca de 75%) permitem a formação de uma casca de poli(estireno) mais satisfatória. Dessa forma, essa foi a condição padrão estabelecida para a realização das polimerizações. As reações de poli(metacrilato de metila) (PMMA) foram conduzidas com duração da etapa de suspensão de 30 minutos, 1h e 2h, a fim de verificar as características resultantes da casca formada. Para esses diferentes tempos de duração, não foi feita qualquer modificação das demais condições reacionais. O MMA é extremamente reativo e o núcleo atinge uma elevada viscosidade (diminuindo a eficiência na captura de nanopartículas) em um tempo curto. Por isso, a formação mais eficiente da casca ocorre com tempos menores de reação. As condições reacionais utilizadas em todas as corridas em suspensão estão detalhadas na Tabela 3.1.

As polimerizações em suspensão foram conduzidas em batelada. O agente em suspensão (PVA) era adicionado na forma de solução e a sua solubilização na quantidade total de água indicada na receita era feita durante o período mínimo de 10 horas na temperatura ambiente. O sistema experimental era ligado e quando a

temperatura do sistema atingia cerca de 40 °C, adicionava-se a solução de PVA e iniciava-se a agitação a 200 rpm. Esse procedimento era feito para minimizar a queda de temperatura do reator quando monômero e iniciador fossem adicionados. As quantidades correspondentes de monômero e iniciador (BPO) eram pesadas, quando o sistema reacional atingia a temperatura desejada. A fim de evitar que a polimerização se iniciasse, a solubilização do iniciador no monômero era feita na temperatura ambiente. A solução monômero/iniciador era adicionada ao reator e a agitação ajustada ao seu valor nominal. Esse instante era considerado como o início da reação de polimerização em suspensão. Os monômeros empregados na polimerização em suspensão foram estireno e metacrilato de metila. A temperatura nominal era estabilizada alguns poucos minutos (2-5) após a adição da fase orgânica.

Tabela 3.1: Condições reacionais usadas nas polimerizações em suspensão.

Componentes	Massa [g]
Monômero	100,0
BPO	4,0
PVA	3,0
Água Destilada	370,0
Agitação: 1000 ± 50 rpm	
Temperatura: 85 °C	

3.4.1.2. Reação de Polimerização em Emulsão

As reações em emulsão eram conduzidas no mesmo reator em que era conduzida a polimerização em suspensão, sem que qualquer separação dos componentes da polimerização em suspensão fosse realizada. As condições experimentais usadas para a etapa em emulsão estão detalhadas na Tabelas 3.2. As soluções de iniciador ($K_2S_2O_8$), agente emulsificante (SLS) e tampão ($NaHCO_3$) eram preparadas previamente, empregando-se, respectivamente, 31,0g, 50,0g e 31,0g de água destilada. As soluções de iniciador e de tampão eram agitadas por cerca de 30 minutos, enquanto a solução de emulsificante era agitada por cerca de 8 horas.

Tabela 3.2: Condições reacionais usadas nas polimerizações em emulsão.

Componentes	Massa [g]
Monômero	100,0
K ₂ S ₂ O ₈	0,3
SLS	2,5
NaHCO ₃	0,3
Água Destilada	115,0
Vazão de Alimentação: 35,0 [g.h⁻¹]	
Agitação: 1000 ± 50 rpm	
Temperatura: 85 °C	

A polimerização em emulsão foi conduzida em semi-batelada, para evitar o descontrole térmico da reação. A velocidade de agitação e a temperatura de reação utilizadas nesta etapa eram as mesmas da polimerização em suspensão. Ao final da primeira etapa de suspensão, adicionava-se no reator, nessa ordem, a solução de surfactante, de tampão e a quantidade de água indicada na receita para completar o meio, com um intervalo de 2 minutos entre cada uma das adições. Após cerca de 5 minutos, colocava-se no reator uma carga inicial de monômero (30g) e, em seguida, a solução de iniciador. O tubo de alimentação de monômero era conectado ao reator e ajustava-se a vazão da bomba ao seu valor nominal, mantendo-a constante. Esse instante era considerado como o início da reação de polimerização em emulsão. A quantidade de monômero alimentada era sempre de 70g. Após o término da alimentação, a polimerização prosseguia por mais 2 horas. Os monômeros empregados na polimerização em emulsão foram estireno, metacrilato de metila, acetato de vinila/metacrilato de metila, benzoato de vinila/metacrilato de metila e divinilbenzeno.

Ao final da polimerização simultânea em suspensão e emulsão, fazia-se a separação da fase sobrenadante da fase decantada (que continha as partículas de polímero). O polímero obtido era filtrado, utilizando água destilada na lavagem. Após a filtração, o material permanecia por cerca de um dia na estufa a vácuo e por dois dias na estufa de circulação na temperatura de 60 °C, antes de ser armazenado e caracterizado.

3.4.2. Reação de Saponificação

A reação de saponificação foi realizada com o objetivo de funcionalizar a casca, constituída de copolímeros de benzoato de vinila/metacrilato de metila, removendo ácido benzóico e promovendo a formação de grupos hidroxilas na cadeia polimérica. As quantidades de reagentes e condições experimentais empregadas na reação de saponificação foram as mesmas descritas por PEIXOTO (2007), como registrado e patenteado na literatura (PINTO *et al.*, 2004b; PEIXOTO *et al.*, 2006; PINTO *et al.*, 2006). As condições da reação de saponificação são apresentadas na Tabela 3.3.

Tabela 3.3: Condições reacionais para a reação de saponificação.

Componentes	Quantidade
Polímero	50,0 g
Água desmineralizada e microfiltrada	200,0 ml
Solução 40% de NaOH	50 ml
Agitação: 500 rpm Temperatura: 30 °C Duração: 2h	

O polímero casca-núcleo empregado na reação de saponificação encontrava-se devidamente purificado. A solução 40% (p/p) de NaOH foi preparada, dissolvendo-se 40,0 g de hidróxido de sódio em 100,0 g de água filtrada e desmineralizada. O sistema reacional era ligado e esperava-se a temperatura estabilizar em 30 °C. As quantidades de polímero e água indicadas eram adicionadas ao reator e a agitação mantida em 200 rpm. Em seguida, 50 ml da solução de NaOH eram também adicionados ao reator. A velocidade de agitação tinha o seu valor ajustado ao valor nominal e esse instante era considerado como o início da reação de saponificação. Ao final dessa etapa, o polímero obtido era filtrado, utilizando água destilada na lavagem. Antes de ser armazenado, o material permanecia por cerca de um dia na estufa a vácuo e por dois dias na estufa de circulação na temperatura de 60 °C.

3.4.3. Reações de Polimerização em Massa

As reações de polimerização em massa foram realizadas com o objetivo principal de determinar a proporção adequada entre comonômeros para produzir copolimerizações não descritas na literatura. Isso se faz necessário quando novos monômeros serão empregados para obtenção dos polímeros casca-núcleo, constituindo uma etapa preliminar de estudo, para garantir o sucesso do procedimento final.

Os testes de polimerização em massa foram conduzidos em tubos de ensaio e com ajuste de temperatura feito diretamente pelo banho de aquecimento. Ao final desse processo, uma pequena quantidade de hidroquinona era adicionada ao tubo de ensaio, a fim de paralisar a polimerização. A quantidade de monômero e as condições operacionais utilizadas nas polimerizações em massa estão descritas na Tabela 3.4. Quando foi feita a homopolimerização, a duração da reação foi de 5h.

Tabela 3.4: Condições reacionais para a polimerização em massa.

Componentes	Quantidade
Monômero	2,0 ml
BPO: 0,08 g Temperatura: 85 °C Duração: 2h	

3.5. Técnicas de Caracterização

Para determinar as propriedades dos materiais poliméricos obtidos, foram utilizadas diversas técnicas de caracterização, a fim de verificar a influência da composição do meio de reação sobre as características da partícula final. Foi dada atenção principalmente à porosidade e à área específica dos materiais preparados, que são propriedades de extrema importância para o desenvolvimento de suportes para a imobilização de enzimas. Os sobrenadantes das reações de polimerização também foram caracterizados.

3.5.1. Microscopia Óptica e Microscopia Eletrônica de Varredura

As partículas poliméricas resultantes tanto da polimerização em suspensão quanto da polimerização simultânea em suspensão e emulsão foram observadas no

microscópio óptico (MO) e no microscópio eletrônico de varredura, a fim de determinar sua morfologia. Esses equipamentos foram descritos na Seção 3.3.

Para observação no MEV, as amostras, sem tratamento prévio, foram depositadas na forma de pó sobre uma fita adesiva dupla face de carbono, afixada em um “stub” de alumínio. As amostras foram analisadas após recobrimento com ouro. Detalhes sobre as condições de operação para a aquisição das imagens, tais como tamanhos de “spot” e distância de trabalho (WD), bem como as ampliações das regiões observadas, estão disponíveis nas legendas das micrografias que serão apresentadas.

3.5.2. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

A técnica de GPC foi usada para a determinação dos valores de massas molares médias e da distribuição de massas molares dos polímeros. A solução polimérica é bombeada através de uma coluna recheada com gel poroso, de modo a fracionar a amostra em função de suas massas molares (ou volume hidrodinâmico, que é o tamanho efetivo da molécula na solução). As moléculas menores penetram nos poros da coluna e, conseqüentemente, demoram mais tempo para serem eluídas. Por outro lado, as moléculas maiores não penetram nos poros e saem mais rapidamente.

É fundamental que ocorra a completa solubilização do polímero na fase móvel usada e que não haja nenhum tipo de interação com a coluna e seu recheio. A faixa de separação dos tamanhos de cadeia depende do tamanho dos poros do material empacotado e a correta determinação das massas molares está relacionada com a seleção correta das colunas. O fluxo de solvente deve ser do tipo empistonado, para minimizar efeitos de separação por difusão (MACHADO, 2002).

Tanto os polímeros casca-núcleo quanto seus respectivos núcleos (resultantes da etapa de polimerização em suspensão) e sobrenadantes foram submetidos à análise de GPC. No preparo das amostras sólidas, pesavam-se 0,15 mg de polímero, que eram dissolvidos em 3 ml de tetrahidrofurano (THF). Para as amostras líquidas, cerca de 400 mg eram pesados (2 gotas) e dissolvidas na mesma quantidade de THF. Após a completa dissolução, fazia-se uma microfiltração com membranas de teflon de 0,45 µm de diâmetro de poro. Após essa etapa, cerca de 300 µl eram injetados no equipamento.

As análises eram conduzidas a 35 °C, usando tetrahidrofurano (THF) como fase móvel e realizadas em duplicata.

3.5.3. Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

As transições características de materiais poliméricos (a temperatura de transição vítrea, T_g, e a temperatura de fusão cristalina, T_m), podem ser identificadas quando o material é aquecido ou resfriado. Os materiais sintetizados nessa tese têm estrutura majoritariamente amorfa e, por isso, caracterizam-se apenas pela presença da T_g, que é caracterizada quando a mobilidade segmental das cadeias poliméricas é reduzida drasticamente (nesse estágio, o material adquire o comportamento de um vidro) (CANEVAROLO, 2004).

A técnica de DSC é capaz de detectar mudanças na capacidade calorífica de uma amostra em função da temperatura, pela medida do fluxo de calor necessário para manter a temperatura diferencial em relação a um padrão igual zero (ODIAN, 2004).

As amostras de polímero e de referência eram colocadas em cápsulas específicas, posicionadas em um disco termoelétrico, e eram aquecidas por uma fonte de calor. O calor era transferido para as amostras por meio do disco e o fluxo de calor diferencial entre ambas as cápsulas era controlado por termopares conectados ao disco. A diferença de temperatura entre o polímero e o material de referência é proporcional à variação de entalpia, à capacidade calorífica e à resistência térmica total ao fluxo calórico (CANEVAROLO, 2004).

A análise de inicia com a geração da linha de base, que é praticamente horizontal em toda faixa de temperatura, por meio de um ensaio com cápsulas vazias. Alguns desvios podem acontecer, em decorrência do acúmulo de resíduos no sensor, vazão do gás de arraste e desgaste natural do equipamento. As análises, tanto para os polímeros quanto para a obtenção da linha de base, devem ser realizadas na mesma faixa de temperatura, taxa de aquecimento e fluxo de gás. A T_g é uma transição de segunda ordem, caracterizada apenas por uma variação de capacidade calorífica; portanto, provoca apenas uma elevação na linha de base (CANEVAROLO, 2004).

Para a realização da análise de DSC, pesavam-se cerca de 10 mg de polímero em uma pequena cápsula, que posteriormente era selada em uma prensa. As amostras eram submetidas a uma taxa de aquecimento de 10 °C/min, usualmente empregada para a análise de polímeros, e em uma faixa de temperatura de 0 – 250 °C. O primeiro aquecimento e resfriamento foram descartados para eliminar a história térmica do material. Para a determinação da Tg, apenas o segundo aquecimento foi considerado. As análises foram feitas em triplicata.

3.5.4. Área Específica e Diâmetro Médio de Poro (BET)

A área específica de um material é geralmente determinada pela quantidade de adsorvato necessária para recobrir a superfície de um adsorvente, na forma de uma monocamada. Os adsorvatos mais comuns são gases. Quando um sólido é exposto a um gás (sistema fechado e com temperatura constante) ocorre um aumento da massa do sólido e diminuição da pressão do gás, até que essas variáveis atingem um valor constante. A quantidade de gás adsorvida é dependente da natureza dessas espécies. Os gases mais empregados nesses procedimentos são nitrogênio e argônio, pois exibem uma adsorção não-específica com qualquer sólido (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Para a obtenção de informações acerca da estrutura porosa de materiais, a determinação da isoterma de adsorção é fundamental. Ela indica a quantidade de gás adsorvido em um sólido, a temperatura constante e em função da pressão do gás. O formato da isoterma é função da porosidade e morfologia do sólido (microporos, mesoporos e macroporos). O método de Brunauer, Emmett e Teller (BET) é normalmente usado para determinar e representar isotermas de adsorção física e é capaz de relacionar os valores obtidos a partir de isotermas de adsorção com os valores de área específica (para isso, considera o volume da monocamada formada). O método BET é adequado para a determinação da área de mesoporos (20-500 Å) e de microporos (< 20 Å) (TEIXEIRA *et al.*, 2001; SALIS *et al.*, 2003).

Em um balão de vidro, a amostra de polímero era pesada, vedada e presa ao equipamento. Iniciava-se um pré-tratamento, com fluxo de nitrogênio, para manter a atmosfera inerte. A amostra era submetida a vácuo e aquecimento, na faixa de 0 a 60 °C, por 24 h. Em seguida, o material era resfriado à temperatura ambiente e colocado em

um frasco com N₂ líquido, sendo aquecido novamente. Essa etapa também tinha duração de 24h. Ao final, o balão era pesado e massa da amostra determinada. Com esse valor e usando um programa específico, a área específica, o diâmetro médio de poro e o volume médio de poro eram determinados.

3.5.5. Distribuição de Tamanho de Partícula (DTP)

3.5.5.1. Particle Size Distribution Analyser (PSDA)

A determinação da distribuição de tamanhos de partículas geradas pela polimerização em suspensão e partículas casca-núcleo com casca de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) foi feita por meio do software PSDA. Para a sua utilização, uma micrografia da amostra era obtida por meio de microscopia óptica (Seção 3.5.1). No programa, pelo menos 300 partículas eram selecionadas, sendo esse número recomendado por proporcionar uma boa precisão para obtenção da distribuição de tamanho de partícula.

3.5.5.2. Analisador de Tamanhos de Partícula Malvern

A determinação da distribuição de tamanhos de partículas realizada no equipamento Malvern baseia-se na técnica de espalhamento de luz laser de baixo ângulo (conhecida genericamente como espalhamento de luz), consistindo em medir os ângulos de difração do raio laser, que se relacionam com o diâmetro da partícula (FRANÇA e COUTO, 2007).

Cerca de 5ml de amostra eram dispersas em água e transferidas para o módulo do equipamento (Hydro 200S) (usava-se uma bomba de vácuo para retirar o ar do meio a ser analisado). A análise ocorria durante 0,5 minutos, usando o comprimento de onda do infravermelho. As análises eram feitas em duplicata na temperatura ambiente. Esse equipamento foi usado para a determinação de distribuição de tamanhos de partículas das partículas casca-núcleo, com exceção daquelas que apresentavam casca de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila). O polímero PMMA/PMMA 2h teve a sua distribuição de tamanhos de partículas determinada pelo analisador LS 13 320, descrito por BESTETI (2009).

3.5.5.3. Analisador de Tamanhos de Partícula ZETA SIZE-NANO

Nesse equipamento, a determinação da distribuição de tamanhos é feita por meio da técnica de espalhamento dinâmico da luz. A amostra era iluminada por um feixe de laser e as partículas mudam de posição no fluido e em respeito às demais, interferindo na intensidade da luz captada pelo detector.

Esse analisador foi utilizado para a determinação da distribuição de tamanhos de partículas presentes no sobrenadante, ao final das reações de polimerização simultânea em suspensão e emulsão. Uma gota da amostra, sem qualquer tratamento prévio, era recolhida com uma pipeta Pasteur e colocada em uma cubeta de vidro. A cubeta era preenchida com água destilada e microfiltrada. Em seguida, a cubeta era transferida para o módulo do equipamento. As análises foram feitas em triplicata na temperatura ambiente.

3.5.6. Determinação do Ângulo de Contato

Uma superfície hidrofóbica é aquela que não pode ser facilmente molhável pela água. Nesse tipo de material, a água não forma um filme contínuo, mas gotas individuais, devido às forças de repelência. Uma superfície é considerada hidrofóbica se o ângulo de contato com a água é maior que 90° e, hidrofílica, se o ângulo de contato for menor que 90° (PRABOWO *et al.*, 2007; NAMEN *et al.*, 2008).

Para a determinação do ângulo de contato dos polímeros casca-núcleo em relação à água, utilizou-se um tensiômetro descrito na Seção 3.3. Primeiramente, foram preparadas pastilhas dos materiais poliméricos a serem analisados, utilizando uma prensa. Em seguida, com um paquímetro, determinava-se o diâmetro e a espessura dessa pastilha, já que esses parâmetros devem ser informados ao programa do tensiômetro. Em seguida, essa amostra era colocada na balança do equipamento, com o auxílio de uma pequena garra (acessório próprio do equipamento). As análises eram feitas em duplicata na temperatura ambiente.

3.5.7. Análise Gravimétrica

As conversões de monômero ao longo da polimerização em suspensão e da polimerização simultânea em suspensão e emulsão foram obtidas por análise gravimétrica. As amostras eram retiradas do reator com o auxílio de um tubo cilíndrico com diâmetro de 0,5 cm e, em seguida depositadas em cápsulas de alumínio, contendo quatro gotas de solução 1% (p/p) de hidroquinona. Ao final da reação, as amostras eram mantidas em uma estufa de circulação a 65 °C até massa constante. A conversão era calculada pela Equação 3.1:

$$X = \frac{M_f - (M_c - M_h)}{\varphi_{org} \cdot M_a} \quad (3.1)$$

sendo M_f a massa de polímero seco (contendo a massa da cápsula e a massa de hidroquinona seca), M_c a massa da cápsula, M_h a massa de hidroquinona seca, M_a é a massa da amostra retirada do reator de polimerização e φ_{org} a fração orgânica inicial do sistema (polímero e monômero).

Essa mesma metodologia foi usada para determinar o teor de sólidos no sobrenadante. Após a completa decantação do polímero, o sobrenadante era separado. Em um béquer com solução 1% (p/p) de hidroquinona, pesava-se uma quantidade sobrenadante, que permanecia em estufa (a 65 °C) até massa constante. O teor de sólidos foi obtido como a relação entre a massa de polímero final e a massa de sobrenadante presente inicialmente no béquer.

3.5.8. Picnometria

A picnometria foi utilizada para a determinação da densidade relativa de amostras sólidas. O picnômetro (Roni Alzi Vidros) utilizado tinha um volume de 50 ml, requerendo manipulação cuidadosa para que não houvesse qualquer influência durante a determinação das massas. A primeira etapa consistia na determinação da massa do picnômetro, completamente vazio e seco. Em seguida, o picnômetro era cuidadosamente preenchido com o solvente, de forma a evitar a formação de bolhas. Ao final do preenchimento, o picnômetro era tampado e o excesso de solvente escorria pelo capilar. Esse excesso era seco com lenço de papel e o picnômetro era colocado na balança, para a determinação da massa de picnômetro com solvente. Essa etapa era

usada para calibração. Ao final da pesagem, o solvente era descartado e o picnômetro era completamente seco com nitrogênio gasoso. Dessa forma, iniciavam-se as medidas com o polímero. Novamente, o picnômetro era pesado, vazio e seco. Em seguida, adicionava-se cerca de 1g de polímero, tomando o cuidado de distribuí-lo uniformemente no fundo do picnômetro. Determinava-se a massa do picnômetro com o polímero. Então, o picnômetro (contendo o polímero) era preenchido com o solvente (de forma a evitar a formação de bolhas), tampado e pesado, determinando-se a massa do conjunto (picnômetro, polímero e solvente). Essas medidas foram realizadas em triplicata. Ao final de cada uma das medidas, o picnômetro era limpo apenas com solventes (álcool e acetona) e seco, para iniciar uma nova medida. O solvente utilizado foi o ciclohexano (com densidade conhecida), sendo a densidade das amostras pode ser calculada da seguinte forma:

$$\rho_P = \frac{(M_4 - M_3) \times \rho_S}{(M_2 - M_1) - (M_5 - M_4 + M_3 - m_1)} \quad (3.2)$$

sendo M_1 a massa do picnômetro vazio e seco (primeira etapa), M_2 a massa do picnômetro com solvente (primeira etapa), M_3 a massa do picnômetro (segunda etapa), M_4 a massa do picnômetro + amostra, M_5 a massa do picnômetro + amostra + solvente, ρ_f a massa específica da amostra e ρ_s a massa específica do solvente.

A determinação das densidades dos polímeros casca-núcleo foi feita apenas para as amostras contendo casca e núcleo de poli(estireno) e de poli(metacrilato de metila) e nas amostras que apresentam divinilbenzeno da sua composição.

3.5.9. Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A espectroscopia de infravermelho permite identificar qualitativamente a composição de uma amostra. Essa técnica baseia-se no princípio de que as ligações químicas de uma substância possuem frequências de vibrações específicas associadas a diferentes níveis de energia. Essas frequências podem ser observadas quando a amostra é submetida à incidência de luz de infravermelha e possui comprimentos de onda na

faixa de 400 a 4000 cm^{-1} (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). A determinação da composição por FT-IR foi realizada nas amostras que contendo copolímeros, a fim de verificar se a copolimerização de fato ocorreu. As amostras eram analisadas na forma sólida, no espectrômetro descrito na Seção 3.3

CAPÍTULO 4

Materiais e Métodos II: Imobilização de Enzimas

O objetivo do presente capítulo é descrever a metodologia empregada para a determinação dos parâmetros de eficiência de imobilização, rendimento da imobilização, retenção de atividade e estabilidade da lipase B de *Candida antarctica*, imobilizada nos polímeros com morfologia casca-núcleo produzidos pela polimerização simultânea e suspensão e emulsão. O procedimento usado para a determinação da atividade enzimática e dos parâmetros de imobilização está descrito em detalhes na literatura (OLIVEIRA *et al.*, 2006; ALMEIDA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009; BRANCO *et al.*, 2010).

4.1. Materiais e Equipamentos

1. Lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B), na forma solúvel, fornecida pela Novo Nordisk;
2. Lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) na forma imobilizada, denominada Novozyme 435, fornecida pela Novozymes (atividade nominal ≥ 10000 UI/g);
3. Etanol, fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%, sendo usado no tratamento dos suportes empregados na imobilização de enzimas;
4. Água destilada, empregada no tratamento dos suportes empregados na imobilização de enzimas;
5. Solução tampão de fosfato de sódio de 5 mM e 25 mM e com pH igual a 7,0;
6. *p*-Nitrofenil laurato, fornecido pela Fluka com pureza mínima de 98%, empregado como substrato para a hidrólise;
7. Acetonitrila, grau UV/HPLC, fornecido pela Tedia Company Inc. com pureza mínima de 99,9%, usado como substrato para a hidrólise;

8. Dimetilsulfóxido (DMSO), grau HPLC/SPECTRO, fornecido pela Tedia Company Inc. com pureza mínima de 99,8%, sendo usado como substrato para a hidrólise;
9. Ácido oléico para síntese, fornecido pela Vetec Química Fina com pureza mínima de 99%;
10. Accurel® MP 1000, fornecido pela Membrana GmbH e à base de polipropileno, suporte comercial usado como comparação ao desempenho dos materiais poliméricos desenvolvidos (tamanhos de partículas < 1500 µm);
11. Espectrofotômetro (Shimadzu, modelo Multi-Spec 1501), usado para a determinação da atividade de hidrólise. Esse equipamento possui um banho termostático acoplado, de forma a manter a temperatura adequada para os testes enzimáticos. A temperatura foi mantida em 30 °C (por meio de um banho de aquecimento ética, modelo TIC-17RGTλ) e as leituras de absorvância foram feitas no comprimento de onda de 410 nm;
12. Espectrofotômetro (Shimadzu, modelo UV-1800), usado para a determinação da atividade de hidrólise. Esse equipamento possui um banho termostático acoplado, de forma a manter a temperatura adequada para os testes enzimáticos. A temperatura foi mantida em 30 °C (por meio de um banho de aquecimento ética, modelo TIC-17RGTλ) e as leituras de absorvância foram feitas no comprimento de onda de 410 nm;
13. Titulador (Metler Toledo, modelo DL50), usado para a determinação da quantidade de éster formado na reação de esterificação;
14. Reatores de vidro de 5 ml, com banho termostático acoplado, para a realização das reações de esterificação.
15. Placas magnéticas para a realização das reações de esterificação;
16. Sistema de filtração à vácuo para a purificação dos suportes contendo os biocatalisadores.

4.2. Imobilização de Lipase por Adsorção Física

A primeira etapa do procedimento padrão usado para a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* consistia no tratamento dos suportes poliméricos. Pesava-se 1g de suporte e, em seguida, o material era colocado em contato com 10 ml de etanol por 30 minutos. Após esse período, adicionavam-se 10 ml de água destilada, sendo que essa mistura permanecia em contato com o polímero por mais 10 minutos. A mistura final

era colocada em um sistema de filtração a vácuo. O suporte tratado era continuamente lavado com água destilada, até eliminar completamente o odor do álcool. Ao final, o suporte era colocado em contato com a solução de fosfato de sódio (25 mM) por cerca de 1 minuto e, depois, filtrado novamente. O suporte seco era guardado em um tubo do tipo falcon. Ao final desse procedimento, 1g de suporte era colocado em contato com 10 ml de solução lipásica (com diferentes unidades, sendo que a diluição da solução enzimática inicial era feita em tampão 5 mM), sendo essa suspensão mantida sob agitação constante de 250 rpm e na temperatura de 4 °C.

O processo de adsorção da lipase nos suportes foi acompanhado por meio da determinação da sua atividade hidrolítica com *p*-nitrofenil laurato, utilizando o sobrenadante da suspensão lipase/suporte. Para isso, cerca de 5 minutos antes de iniciar a medição da atividade, a suspensão de lipase/suporte era retirada da agitação, a fim de que o material sólido decantasse (os suportes casca-núcleo apresentavam esse comportamento, já o Accurel MP 1000 permanecia na superfície da suspensão). A solução de substrato da reação de hidrólise era constituída por 8 mg de *p*-nitrofenil laurato, 5 ml acetonitrila e 5 ml DMSO. No preparo do meio reacional para a enzima, 2,2 ml de solução tampão de fosfato de sódio (25 mM e pH 7,0) e 0,25 ml de solução de substrato eram termostatizados a 30 °C, no próprio espectrofotômetro. Ao atingir a temperatura desejada, 0,05 ml do sobrenadante da suspensão lipase/suporte era adicionado, iniciando-se a reação que leva à formação do produto cromóforo *p*-nitro fenol. O progresso da reação era acompanhado por espectrofotômetro com leituras de absorvância a 410 nm. Com isso, obtinha-se o valor da atividade hidrolítica naquele instante, determinada de acordo com a Equação 4.1. Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 µmol de *p*-nitro fenol por minuto, nas condições do ensaio.

Esse procedimento foi realizado durante todo o processo de imobilização (24 horas), ao final do qual se considerava que a imobilização já não ocorria de forma significativa. Como a enzima adsorvia no suporte ao longo do tempo, a atividade hidrolítica do sobrenadante diminuía. A atividade inicial da solução lipásica (antes da mistura com suporte) também era determinada e, nesse trabalho, teve valores que variaram de 40UI a 800UI, como será detalhado nas próximas seções. Ao final da etapa de imobilização, o biocatalisador (nesse trabalho, esse termo referencia-se ao suporte já

com a enzima imobilizada) era separado, por filtração simples, lavada com água destilada e armazenado a 4 °C.

$$A' = \frac{(Abs/min) \times V_{final} \times f}{V_{am}} \quad (4.1)$$

Sendo:

A': atividade lipásica, [UI/ml] ou [UI/g de suporte];

V_{final}: volume final do meio reacional [ml];

V_{am}: volume da amostra, [ml] ou massa do suporte [g];

f: fator obtido na curva de calibração de p-nitro fenol [mM].

4.3. Dosagem da Atividade Hidrolítica do Biocatalisador

A determinação da atividade hidrolítica de p-nitro fenil laurato com a formação do produto cromóforo p-nitro fenil também foi usada para a determinação da atividade do biocatalisador, de forma similar ao descrito anteriormente. Nesse caso, adicionava-se cerca de 10 mg de biocatalisador na solução de substrato e, à medida que a reação prosseguia, e em determinados intervalos de tempo, uma amostra era retirada e analisada por espectrofotômetro com leituras de absorbância a 410 nm. A atividade hidrolítica foi determinada de acordo com a Equação 4.1. Uma unidade internacional (UI) foi definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1,0 µmol de p-nitro fenol por minuto, nas condições do ensaio.

4.4. Determinação dos Parâmetros de Imobilização

Com a determinação dos valores de atividade enzimática ao longo do processo de imobilização e da atividade do biocatalisador, os parâmetros de imobilização foram determinados, de acordo com as Equações 4.2 a 4.5, detalhadas a seguir (FREIRE, 1998).

Eficiência de Imobilização (E_{imo})

$$E_{imo} (\%) = \frac{U_{teo} \cdot 100}{U_c} \quad (4.2)$$

Retenção de Atividade (R_a)

$$R_a (\%) = \frac{U_{imo} \cdot 100}{U_{teo}} \quad (4.3)$$

Rendimento de Imobilização (η)

$$\eta (\%) = \frac{U_{imo} \cdot 100}{U_c} \quad (4.4)$$

Sendo que:

U_{imo} : unidades totais de enzimas imobilizadas (atividade do biocatalisador) [UI];

U_c : unidades totais de enzimas que são colocadas na etapa inicial da imobilização [UI];

U_s : unidades totais de enzimas que não reagiram com o suporte e estão presentes no sobrenadante [UI];

U_{teo} : unidades totais de enzimas teoricamente imobilizadas, definido como:

$$U_{teo} = U_c - U_s \quad (4.5)$$

4.5. Dosagem da Atividade de Esterificação do Biocatalisador

A atividade de esterificação foi quantificada por meio da reação entre ácido oléico e etanol, que era conduzida na temperatura de 40 °C e durante 2 horas. O etanol utilizado nessa etapa era colocado previamente em contato com uma peneira molecular, a fim de eliminar a água que pudesse influenciar na reação de esterificação. Utilizavam-se 9g de ácido oléico, 1,5 g de álcool tratado e 3% (m/m) de enzima. O meio reacional

permanecia em reator aberto, com banho acoplado para manutenção da temperatura. A agitação empregada era magnética. Em intervalos determinados, alíquotas de 200 µl eram retiradas do meio reacional, sempre em triplicata. Para a extração do ácido oléico da mistura contida na alíquota, adicionavam-se 20 ml de solução de acetona com álcool (1:1) (v/v). Essa solução também paralisava a reação. A quantidade de ácido oléico consumido foi determinado por titulação com NaOH (0,02 N), utilizando o titulador descrito na Seção 4.1. Uma unidade de atividade enzimática de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que esterifica 1,0 µmol de ácido graxo por minuto, nas condições do ensaio. A atividade enzimática era determinada pela seguinte equação:

$$A = \frac{(V_a - V_b) \times 1000 \times N \times V_{final}}{t \times V_e \times M} \quad (4.6)$$

Sendo:

A: atividade de esterificação [µmol/ min. M_{IME} ou UI/g];

V_a: volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero [mL];

V_b: volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após o tempo t [mL];

N: normalidade da solução de NaOH [mmol/mL];

V_{final}: volume final de meio reacional [mL];

M: massa da enzima imobilizada utilizada na reação [g];

V_e: volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação [mL];

t: tempo [min].

4.6. Estabilidade de Estocagem

A enzima imobilizada (na forma liofilizada) era estocada em um dessecador à vácuo, em temperatura ambiente e durante 65 dias. Durante esse período, foi feita a determinação de sua atividade hidrolítica, a fim de determinar a sua estabilidade. O objetivo era identificar a eventual perda de atividade por conta da dessorção, desnaturação ou inibição por interação com o suporte.

CAPÍTULO 5

Resultados e Discussão I: Reações de Polimerização

Este capítulo tem como objetivo fundamental analisar o desenvolvimento de partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo por meio da polimerização simultânea em suspensão e emulsão, para serem aplicadas como suportes para a imobilização de enzimas. Além disso, faz-se um estudo detalhado das variáveis que influenciam a formação da estrutura porosa nesse processo de polimerização.

5.1. Introdução

A polimerização simultânea em suspensão e emulsão é capaz de produzir materiais com estrutura bastante peculiar e a grande vantagem de sua utilização para a produção de suportes poliméricos é que, em uma única etapa e sem a presença de quaisquer outros aditivos, são formados produtos com boas características morfológicas. Além disso, a composição da casca pode ser facilmente alterada para se adaptar às propriedades das enzimas a serem imobilizadas. Nenhuma funcionalização se faz necessária, diferentemente de muitos suportes disponíveis atualmente, o que torna o processo de obtenção simplificado e com baixo custo, condições necessárias e adequadas para a obtenção de bons suportes.

BESTETI (2009) fez um estudo detalhado sobre partículas com morfologia casca-núcleo com distintas composições no núcleo e na casca. A análise dos valores de área específica e diâmetro de poro apresentados por esses materiais comprovaram que esses materiais são suportes potenciais para a imobilização de enzimas. Dessa forma, esses polímeros foram empregados para os testes enzimáticos iniciais, como será detalhado no próximo capítulo. A partir dos estudos prévios, diversas melhorias puderam ser sugeridas, conforme será detalhado nas próximas seções. A Tabela 5.1

sintetiza algumas características desses materiais, fundamentais para a imobilização, como área específica e diâmetro de poro.

Tabela 5.1: Características de polímeros casca-núcleo preparados por BESTETI (2009).

Polímeros	Dp [Å]	Área Específica [m²/g]
PS/PS 4	218,8	7,9
PS/PMMA 2	141,2	36,7
PS/PMMA 2S	133,3	30,5
PS/PMMA 4	195,0	0,9
PS/PVAc 2	0,0	0,0
PS/PVAc-co-PMMA 3	0,0	0,0
PS/PVAc-co-PMMA 3S	0,0	0,0
PS/PS-co-PC 2	251,2	6,2
PMMA/PS 2	272,3	8,7
PMMA/PS 4	354,0	3,4

*Na nomenclatura, o primeiro nome refere-se à composição do núcleo e, o segundo, à composição da casca. O número representa o momento (em horas) de adição da mistura reacional da emulsão. S representa que o material foi saponificação.

A Tabela 5.1 mostra que BESTETI (2009) explorou principalmente os materiais produzidos com núcleo de poli(estireno). Observou-se que a natureza do material produzido em emulsão afetava significativamente a morfologia das partículas casca-núcleo produzidas. Por isso, foram propostas algumas modificações nessas composições básicas, a fim de melhorar os desempenhos dos suportes poliméricos na imobilização de enzimas. Em particular, pretendia-se aumentar a área específica das partículas. É importante ressaltar que os valores de área específica obtidos são referentes à partículas toda, ou seja, considera a casca e o núcleo, cuja área específica é muito baixa e próxima de zero.

5.2. Polímeros Casca-Núcleo de Poli(metacrilato de metila)

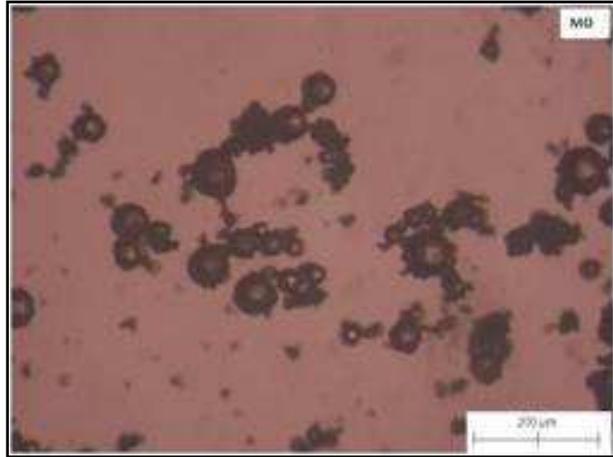
O poli(metacrilato de metila) (PMMA) é um material com boa resistência mecânica e com menor polaridade que o poli(estireno) (PS). Como demonstrado por BESTETI (2009), a adição de PMMA na composição de polímeros casca-núcleo gerou partículas com uma área específica considerável e, como será detalhado posteriormente, bons parâmetros de imobilização.

O PMMA apresenta um efeito gel bastante pronunciado e, portanto, o núcleo atinge uma elevada viscosidade rapidamente, o que, conseqüentemente, dificulta a captura de partículas geradas pela emulsão (LENZI 2002, LENZI *et al.*, 2003; BESTETI 2009). Por isso, foi proposta a análise das características da casca formada para três valores distintos de duração da etapa de suspensão, que foram 30 minutos, 1h e 2h. A etapa de suspensão com 4h de duração não foi considerada, pois os resultados mostrados por BESTETI (2009) indicavam que a casca formada era bastante fina; ou seja, ocorria baixa eficiência de captura das nanopartículas geradas pela polimerização em emulsão.

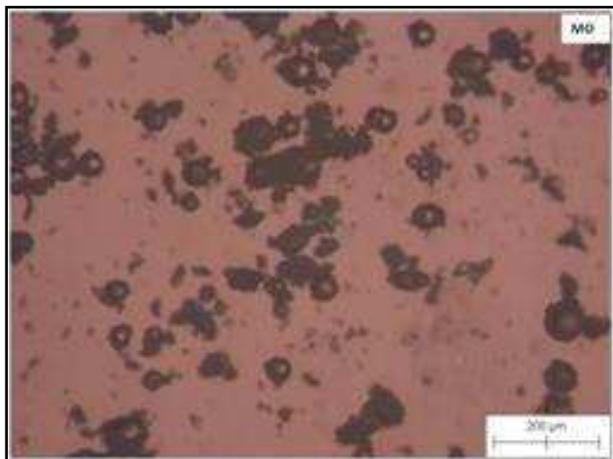
Nas partículas poliméricas à base de poli(metacrilato de metila), foi proposta a adição de benzoato de vinila, com duração da etapa de suspensão de 1h e 2h. O uso de benzoato de vinila foi proposto como uma alternativa à produção de uma casca contendo acetato de vinila. Quando acetato de vinila foi usado para preparar a casca, as partículas apresentavam área específica igual a zero (BESTETI, 2009), o que impedia a imobilização de enzimas. Maiores detalhes serão fornecidos no próximo capítulo.

5.2.1. Núcleo de Poli(metacrilato de metila)

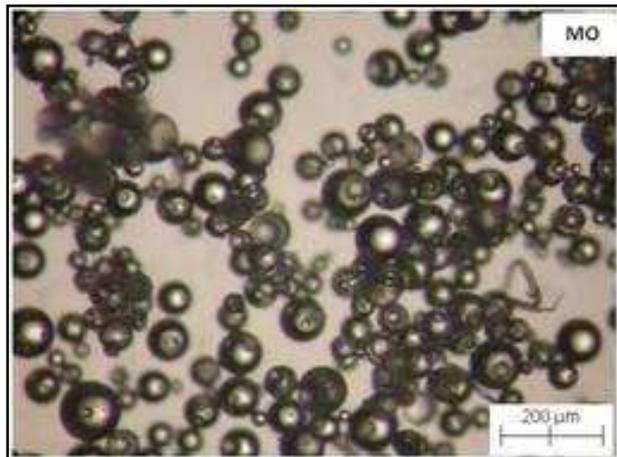
As micrografias das partículas de poli(metacrilato de metila) (PMMA), obtidas por meio da polimerização em suspensão com duração de 30 minutos, 1h e 2h, denominadas respectivamente de PMMA 30 min, PMMA 1h e PMMA 2h, estão ilustradas na Figura 5.1. Apesar das polimerizações terem sido conduzidas com diferentes durações, as morfologias obtidas foram bastante similares, com partículas esféricas e larga distribuição de tamanhos. As partículas poliméricas de PMMA 30 min e PMMA 1h apresentam-se um pouco aglomeradas e isso ocorre por causa da alta viscosidade do material e menores conversões.



(A)



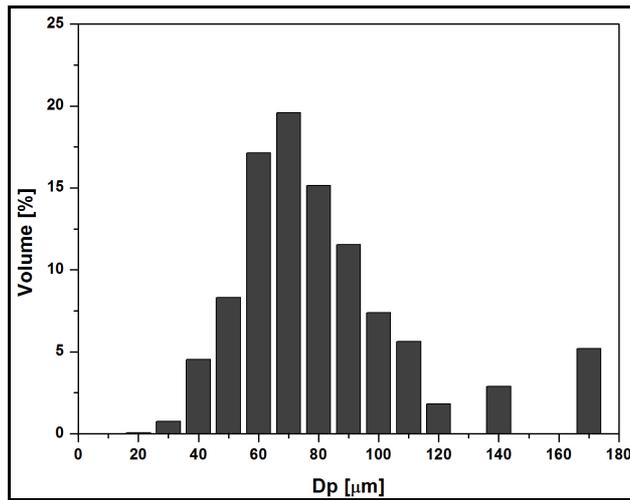
(B)



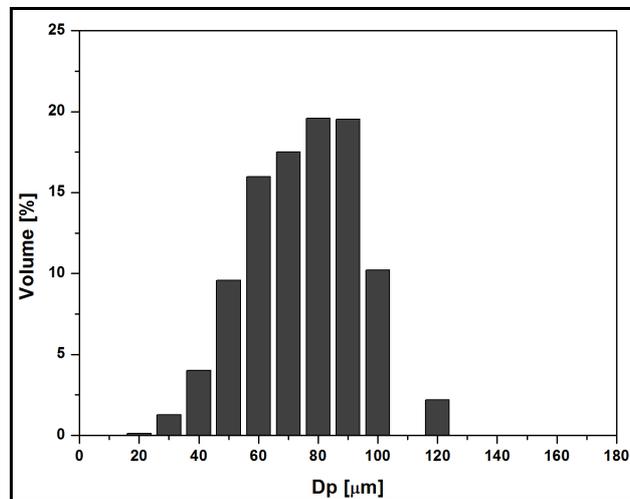
(C)

Figura 5.1: Micrografias de PMMA resultantes da polimerização em suspensão com duração de (A) 30 min, (B) 1h e (C) 2h.

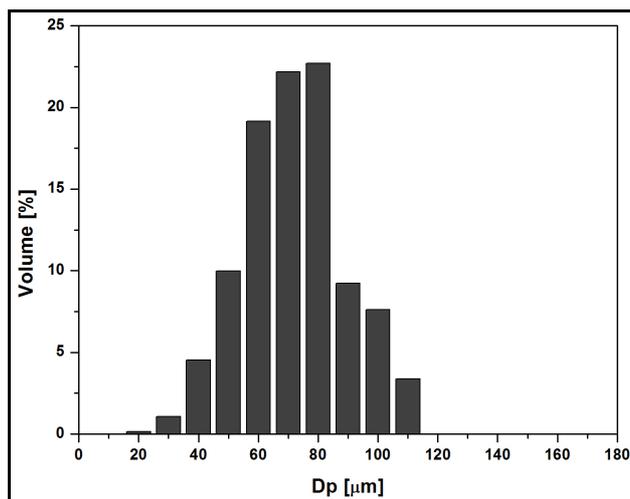
As distribuições de tamanhos de partículas estão ilustradas na Figura 5.2.



(A)



(B)



(C)

Figura 5.2: Distribuição de tamanhos de partículas de (A) PMMA 30 min, (B) PMMA 1h e (C) PMMA 2h, resultantes da polimerização em suspensão.

Para PMMA 30 min, o diâmetro médio das partículas foi de 52,6 μm ; para PMMA 1h, o diâmetro médio foi de 44,6; e para PMMA 2h, foi de 51,2 μm . Esses diâmetros são similares, indicando que a duração da etapa de suspensão não influencia de forma apreciável essa propriedade. Esses tamanhos são inferiores aos apresentados por SANTOS (2007) mas isso está relacionado com o uso de condições operacionais ligeiramente distintas das utilizadas por ele. Observa-se, no entanto, que as DTPs são um pouco diferentes, em função do bem conhecido mecanismo de quebramento (predominante no início) e coalescência (predominante no final), que desloca as modas da DTP ao longo do tempo.

A evolução da conversão de uma reação de polimerização em suspensão de MMA com duração de 2h é mostrada no gráfico da Figura 5.3. Ao final de 2h, a conversão alcançada está em torno de 80%. Pode-se notar ainda que, com pouco tempo de reação, a conversão alcança valores elevados, em consequência do efeito gel.

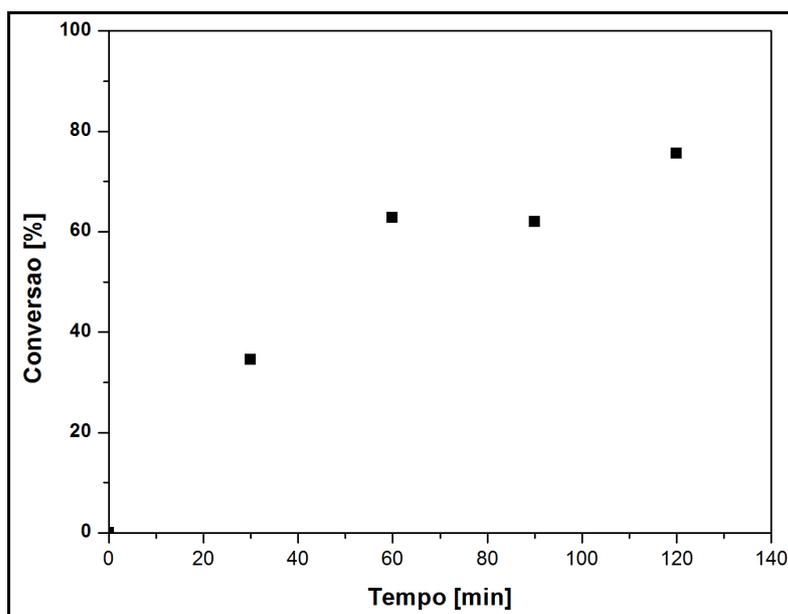


Figura 5.3: Conversão de PMMA.

As distribuições de massas molares das partículas de PMMA, oriundas apenas de uma etapa de polimerização em suspensão estão ilustradas na Figura 5.4. Os valores de massa molar ponderal média (M_w) e índice de polidispersão são apresentados na Tabela 5.2. Os valores de M_w são bastante elevados para todos os casos e pode-se notar a formação de um ombro nas curvas de distribuição de massas molares. Esse

comportamento é consequência do efeito gel, comum nas polimerizações envolvendo metacrilato de metila. Em função da redução das taxas de terminação, as distribuições de massas molares são deslocadas para valores mais altos com o aumento da conversão. A redução subsequente da concentração de monômero promove a redução final das massas molares médias. Os valores de M_w são similares aos encontrados por SANTOS (2007) para polimerizações de PMMA em suspensão.

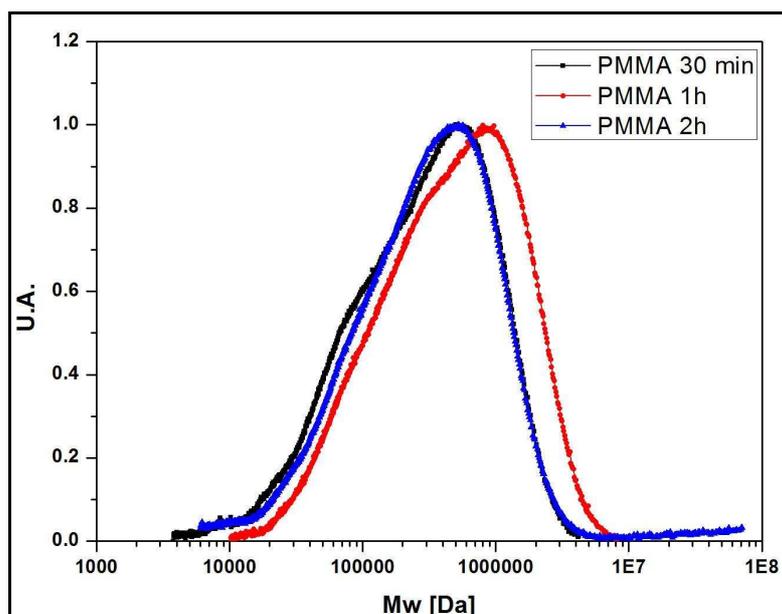


Figura 5.4: Distribuição de massas molares de PMMA (■) 30 min, (▼) 1h e (▲) 2h.

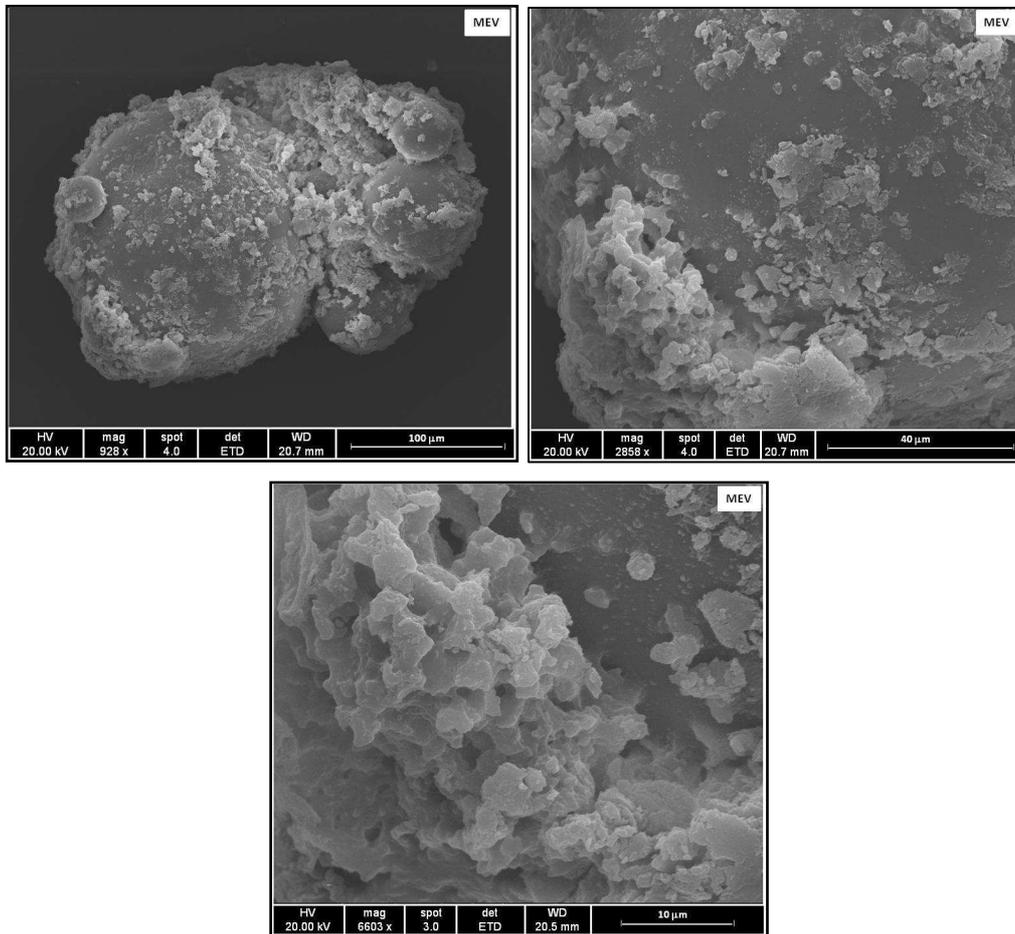
Tabela 5.2: Valores de M_w e IP de PMMA.

PMMA	M_w [Da]	IP [-]
30 min	409×10^3	4,3
1h	534×10^3	5,7
2h	451×10^3	3,9

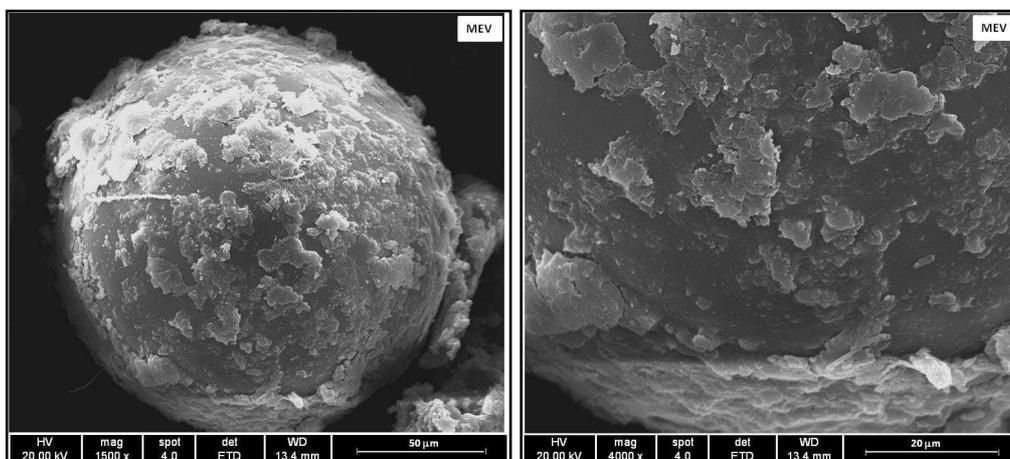
Pode-se concluir, portanto, que a polimerização em suspensão de metacrilato de metila resulta em altas conversões com pouco tempo de reação. Essa característica decorrente do efeito gel afeta diretamente as outras propriedades do material.

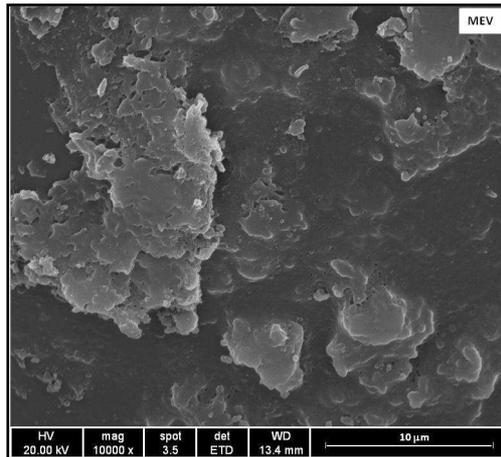
5.2.1.1. Casca de Poli(metacrilato de metila)

As partículas de polímero com núcleo e casca de poli(metacrilato de metila) obtidas ao final de diferentes tempos de etapa de suspensão, 30 min, 1h e 2h, foram denominadas respectivamente de PMMA/PMMA 30 min, PMMA/PMMA 1h e PMMA/PMMA 2h. Micrografias dos materiais obtidos estão ilustradas na Figura 5.5.

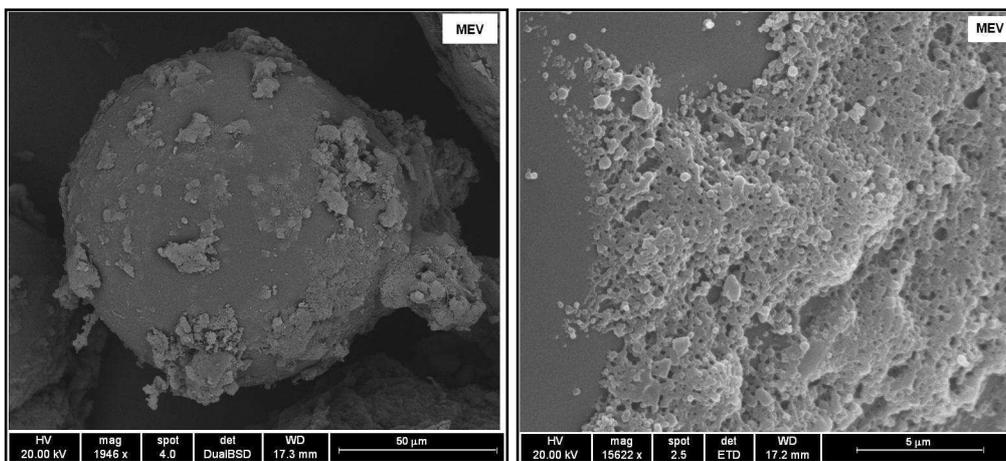


(A)





(B)



(C)

Figura 5.5: Micrografias de PMMA/PMMA (A) 30 min, (B) 1h e (C) 2h.

As micrografias das partículas de PMMA/PMMA obtidas indicam que esses materiais são bastante porosos. Os polímeros casca-núcleo produzidos com duração da etapa de suspensão de 30 min e 1h foram similares, em relação ao maior recobrimento

das partículas do núcleo. Com relação às partículas produzidas com duração da polimerização em suspensão de 2h, as partículas não se apresentaram perfeitamente recobertas, uma vez que a viscosidade do núcleo era muito elevada e dificultava a captura das partículas emulsificadas, geradas pela polimerização em emulsão. Porém, nesse último caso, a deposição das nanopartículas ao redor do núcleo parece ser mais organizada, deixando mais evidente a porosidade da casca.

Os valores do teor de sólidos, diâmetro médio das partículas emulsificadas (Apêndice A, Figuras A1 e A2), massa molar ponderal média e índice de polidispersão das partículas presentes no sobrenadante são apresentados na Tabela 5.3. As distribuições de massas molares estão ilustradas na Figura 5.6.

Tabela 5.3: Valores do teor de sólidos, diâmetro médio, Mw e IP das partículas do sobrenadante de PMMA/PMMA.

PMMA	Teor de Sólidos [%]	Diâmetro Médio [nm]	Mw [Da]	IP [-]
30 min	13,72 ± 0,08	265,7 ± 4,3	322×10 ³	5,5
1h	4,67 ± 0,08	232,2 ± 3,0	3,3×10 ³	1,5

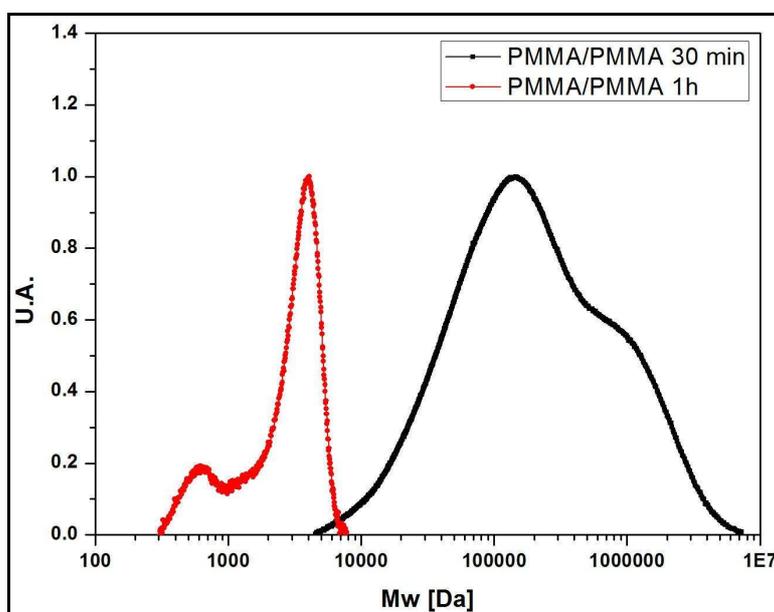


Figura 5.6: Distribuição de massas molares do sobrenadante de PMMA/PMMA.

À medida que a duração da etapa de polimerização em suspensão aumenta, o teor de sólidos e a massa molar ponderal média das partículas emulsificadas diminuem, indicando uma captura mais eficiente pelo núcleo. Apesar de com 30 min de duração da etapa de suspensão a conversão e o valor de Mw serem elevados (como mostrado anteriormente), as partículas geradas pela polimerização em suspensão ainda não estão suficientemente viscosas e pegajosas e, portanto, não são capazes de capturar as nanopartículas emulsificadas de forma eficiente. Isso também justifica os menores diâmetros das partículas.

As distribuições de massas molares dos polímeros casca-núcleo de PMMA estão ilustradas na Figura 5.7 e os valores de Mw e IP são apresentados na Tabela 5.4.

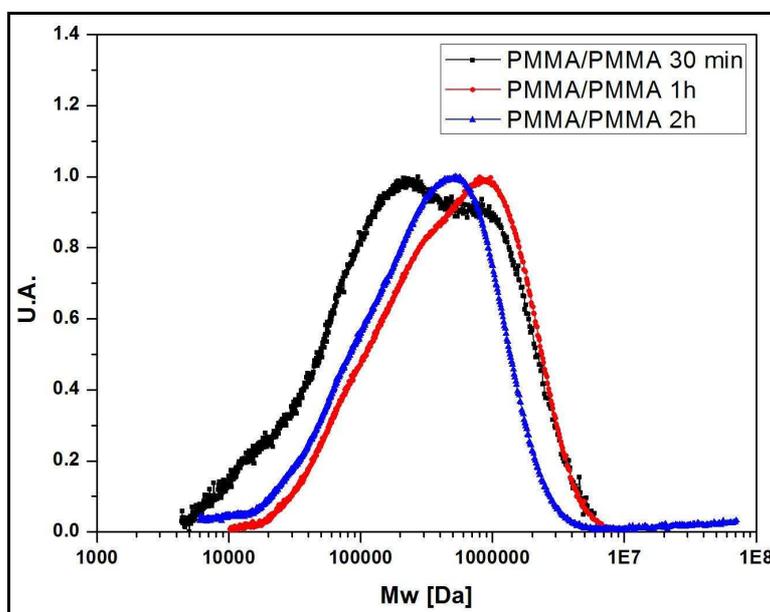


Figura 5.7: Distribuição de massas molares de PMMA/PMMA (■) 30 min, (●) 1h e (▲) 2h.

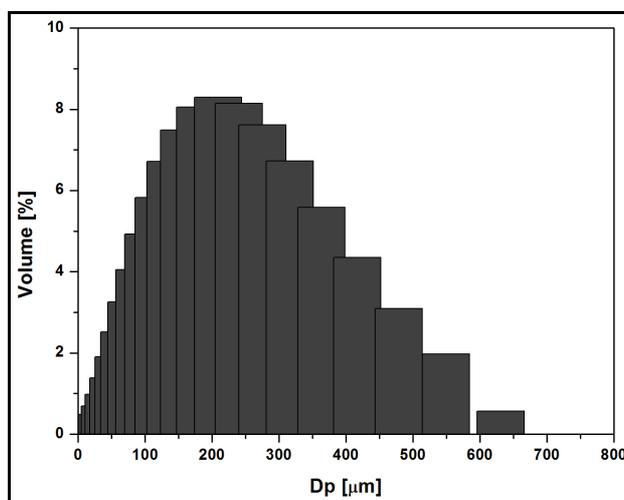
Tabela 5.4: Valores de Mw e IP de PMMA/PMMA.

PMMA	Mw [Da]	IP [-]
30 min	523×10^3	7,3
1h	677×10^3	4,2
2h	435×10^3	3,8

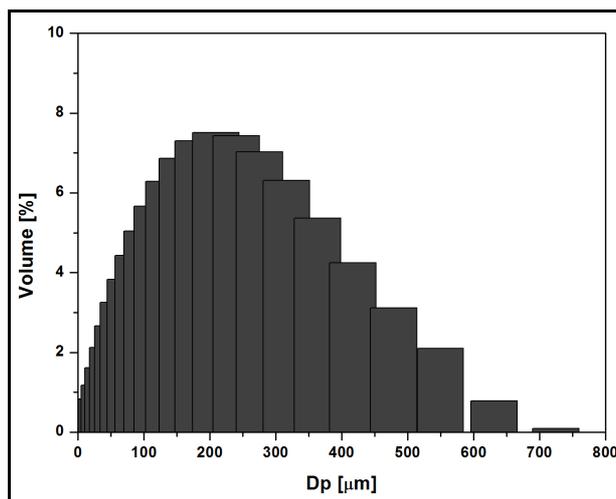
Pode-se notar que as curvas apresentam características bimodais e com elevados valores de Mw e IP em todos os casos. As massas molares médias são maiores que as obtidas em suspensão, por causa das partículas produzidas em emulsão, com maiores massas molares médias. Portanto, esses valores são muito influenciados pela distribuição de massas molares do PMMA, tanto na suspensão quanto na emulsão. Quando a suspensão tem duração de 2h, o valor de Mw diminui, indicando uma maior interação entre núcleo e casca, como observado por LENZI (2002), LENZI *et al.* (2003) e BESTETI (2009). Nesse caso, as partículas casca-núcleo comportam-se como se fossem oriundas de apenas uma polimerização em suspensão, indicando que a polimerização em emulsão não foi eficiente, ajudando a explicar a inexistência de casca como observado por LENZI (2002), LENZI *et al.*, (2003) e BESTETI (2009). Nos último caso, os índices de polidispersão são compatíveis aos obtidos em suspensão, reforçando a idéia de que a reação em emulsão não foi eficiente.

As partículas de PMMA/PMMA 30 min apresentaram Tg no valor de 116,5 °C; as partículas de PMMA/PMMA 1h apresentaram Tg de 121,4 ± 0,4 °C e as partículas de PMMA/PMMA 2h apresentaram Tg de 113,4 °C. Com a duração da etapa de suspensão de 1h, as partículas poliméricas apresentaram o maior valor de Tg e isso pode estar relacionado as massas molares mais elevadas com uma formação mais efetiva da casca ao redor do núcleo (Apêndice B, Figuras B1 – B3).

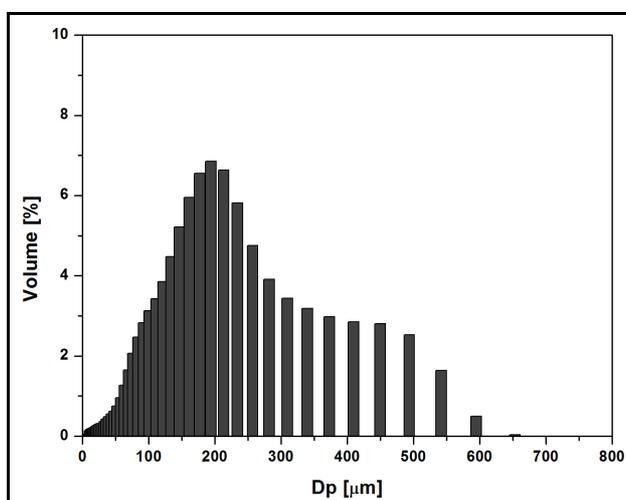
As distribuições de tamanhos de partículas são apresentadas na Figura 5.8.



(A)



(B)



(C)

Figura 5.8: Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA (A) 30 min, (B) 1h e (C) 2h.

Os diâmetros médios das partículas de PMMA/PMMA 30 min, PMMA/PMMA 1h e PMMA/PMMA 2h foram respectivamente, iguais a 206,1 μm , 201,2 μm e 212,9 μm . Esses valores são superiores aos encontrados para os respectivos núcleos, indicando que houve a formação de aglomerados. Não foi observada diferença significativa dos tamanhos médios de partículas para diferentes durações da etapa de polimerização em suspensão. Esse comportamento, de aumento da distribuição de tamanhos, também foi constatado por LENZI *et al.* (2003), ZHENQIAN *et al.* (2008), BESTETI, (2009) e PENG *et al.* (2011). Portanto, a formação da casca porosa é acompanhada de aglomerados. No caso da suspensão de 2h, observa-se com clareza a formação de múltiplas modes, característica dos processos de aglomeração.

Os valores de área específica, diâmetro médio de poro e ângulo de contato para os polímeros casca-núcleo de PMMA são apresentados na Tabela 5.5. A determinação do ângulo de contato permite mensurar o grau de hidrofobicidade dos polímeros desenvolvidos e verificar a sua interação com a enzima imobilizada, como será apresentado no próximo capítulo.

Tabela 5.5: Valores de área específica, diâmetro médio de poro e ângulo de contato de PMMA/PMMA.

PMMA	Área Específica [m ² /g]	Dp [Å]	Ângulo de Contato [°]
30 min	6,1	175,4	70,81 ± 2,61
1h	5,0	211,6	74,50 ± 3,66
2h	3,7	213,6	75,67 ± 0,83

Quanto menor a duração da etapa de suspensão, maior é o valor da área específica; porém os valores encontrados não exibem uma grande diferença entre si. Os valores apresentados na Tabela 5.5 são compatíveis com valores reportados anteriormente por BESTETI (2009). É interessante observar que BESTETI (2009) observou uma relação entre o diâmetro médio de poro e as dimensões características das partículas emulsificadas presentes no sobrenadante, confirmando a idéia de que essas nanopartículas se agregam umas sobre as outras para gerar a porosidade final do material. Esse efeito não pode ser observado na série de reações de PMMA realizadas. Em relação ao ângulo de contato, todos os materiais são hidrofílicos (ângulo de contato menor que 90°) e também não apresentam diferenças significativas entre si.

5.2.1.2. Casca de Poli(metacrilato de metila-co-benzoato de vinila)

O benzoato de vinila foi escolhido como um possível substituto do acetato de vinila na formação da casca. As partículas poliméricas desenvolvidas por BESTETI (2009) com núcleo de poli(estireno) e com casca de poli(acetato de vinila) (PS/PVAc) e de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) (PS/PVAc-PMMA) apresentavam área específica igual a zero (conforme demonstra a Tabela 5.1) e isso impede a adsorção efetiva de enzimas (como será mostrado no próximo capítulo). BESTETI (2009)

verificou que a formação da casca porosa está diretamente relacionada com a temperatura de transição vítrea do material constituinte da casca. Como propõe-se em utilizar um éster de vinila para posteriormente realizar a saponificação e induzir a formação de poros, o benzoato de vinila foi escolhido como alternativa, já que a sua Tg está em torno de 70 °C (BRANDUP *et al.*, 1999).

Dessa forma, alguns testes de polimerização foram propostos, a fim de verificar as condições reacionais adequadas para polimerizar o benzoato de vinila e verificar as propriedades do polímero obtido, principalmente em relação ao valor da Tg. A homopolimerização não conduziu a bons resultados, originando um produto viscoso e de difícil manipulação. Esse comportamento foi provavelmente decorrente da baixa conversão atingida, apesar da reação ter tido uma duração de até 5 horas. Diante disso, optou-se por realizar a copolimerização com o metacrilato de metila (MMA), já que esse monômero tem boa reatividade e os parâmetros de imobilização em suportes com sua participação na composição exibiram bons resultados (como será mostrado no próximo capítulo).

Dessa forma, diferentes quantidades de metacrilato de metila foram copolimerizadas com o benzoato de vinila em massa. As amostras finais eram sólidas em todos os casos e foram submetidas à análise de DSC para determinação de suas respectivas Tg. Com esses dados, informações sobre a efetiva incorporação do benzoato de vinila, bem como da possibilidade da formação de uma casca porosa por meio de processo de polimerização simultânea em suspensão e emulsão, foram obtidas. Foi feito um teste com metacrilato de metila puro, que foi utilizado com referência. As quantidades de cada monômero e os resultados de Tg para a copolimerização de metacrilato de metila e benzoato de vinila estão indicados na Tabela 5.6 e os gráficos de DSC estão ilustrados no Apêndice B (Figuras B4-B7).

A análise dos valores mostrados pela Tabela 5.6 permite perceber que à medida que a quantidade de benzoato de vinila no meio reacional aumenta, ocorre uma redução do valor de Tg do polímero final. Esses dados indicam incorporação de benzoato de vinila no copolímero final. Entre as amostras REC1 e REC2, com a diminuição da quantidade de metacrilato de metila, não houve uma modificação considerável no valor

de Tg. Contudo, em REC3 a mudança no valor de Tg é bem pronunciada. Com isso, utilizando-se qualquer uma dessas combinações, com exceção de REC4, a Tg do polímero a ser obtido estará acima de 65 °C, temperatura proposta para a polimerização. Em alguns casos, a temperatura reacional de 85 °C poderá ser mantida, viabilizando a produção de partículas casca-núcleo, com casca porosa.

Tabela 5.6: Valores de Tg para a copolimerização de metacrilato de metila e benzoato de vinila em massa a 85°C.

	REC 1	REC 2	REC 3	REC 4
MMA [ml]	2,0	1,6	1,0	0,4
BV [ml]	0,0	0,4	1,0	1,6
Tg [°C]	99,7	99,9	69,1	49,5

No Apêndice C (Figura C1) é apresentado o espectro de FT-IR de uma amostra de PMMA puro. As bandas de adsorção de ligações C=O localizaram-se em torno de 1722 cm^{-1} e as bandas referentes às ligações C-H estavam presentes em 2950 cm^{-1} . Quando foi feita a adição de benzoato de vinila (como na reação R2), o espectro de FT-IR (ilustrado na Figura C2, Apêndice C) apresentou bandas em torno de 710 – 800 cm^{-1} , que são características de anéis aromáticos, como encontrado na estrutura do benzoato (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Dessa forma, a copolimerização proposta entre metacrilato de metila e benzoato de vinila de fato ocorre. Isso também pode ser comprovado pela determinação das massas molares das amostras de R1 e R2, ilustradas na Figura 5.9.

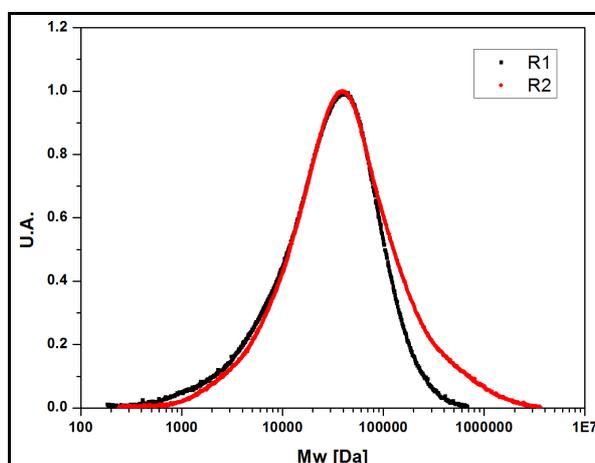


Figura 5.9: Distribuição de massas molares de R1 e R2.

As curvas de R1 e R2 são similares, entretanto, para o caso de R2, há um deslocamento para valores maiores. Para R1, a massa molar ponderal média foi de 44×10^3 e o índice de polidispersão foi de 3,0. Já para R2, os valores de Mw e IP são respectivamente iguais a 80×10^3 e 4,4. A diferença dos valores de Mw e IP entre as reações R1 e R2 também indicam que houve a incorporação do benzoato de vinila na estrutura do copolímero.

Com base nesses resultados, a reação contendo 20% de benzoato de vinila na receita da casca (REC2) foi realizada. A reação REC3 não foi feita, pois a temperatura do meio reacional seria muito baixa, não sendo adequada para o iniciador empregado (persulfato de potássio). A duração da etapa de suspensão foi de 1h. Um teste inicial com duração de 2h foi feito, mas não conduziu a bons resultados. As micrografias das partículas com núcleo de poli(metacrilato de metila) e casca de poli(metacrilato de metila-co-benzoato de vinila) (PMMA/PMMA-BV) estão ilustradas na Figura 5.10. Nessas micrografias, é possível notar a deposição das nanopartículas ao redor do núcleo original. A aglomeração das nanopartículas permite o recobrimento satisfatório do núcleo, gerando a porosidade final do material.

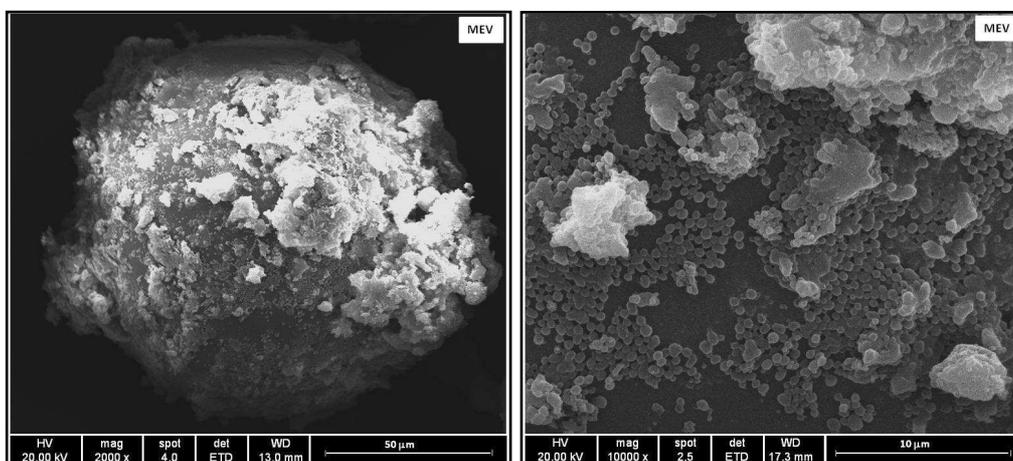


Figura 5.10: Micrografias de PMMA/PMMA-BV.

O teor de sólidos do sobrenadante foi de $13,72 \pm 0,08\%$, sendo que o diâmetro médio das partículas emulsificadas é de $203,9 \pm 1,5$ nm (Apêndice A, Figuras A3). Esses resultados indicam que a eficiência de captura foi baixa. O teor de sólidos foi superior ao encontrado nas partículas do sobrenadante de PMMA/PMMA 1h, e isso pode ser explicado pela menor reatividade exibida pela benzoato de vinila, mesmo

quando copolimerizado com o metacrilato de metila. A análise de GPC do sobrenadante está ilustrada na Figura 5.11.

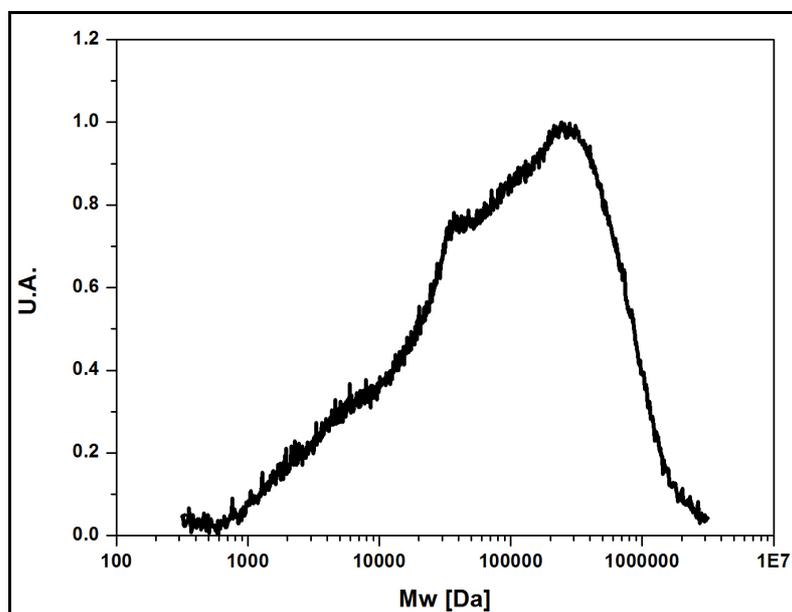


Figura 5.11: Distribuição de massas molares do sobrenadante de PMMA/PMMA-BV.

Os valores de Mw e IP foram respectivamente iguais a 244×10^3 Da e 11,1. A curva é bimodal devido ao efeito gel do metacrilato de metila e o elevado valor de Mw é característico dos processos em emulsão. O índice de polidispersão apresenta um valor bastante elevado, indicando que o sobrenadante pode conter resíduos das partículas que constituem o núcleo.

A distribuição de massas de PMMA/PMMA-BV está ilustrada na Figura 5.12. Os valores de Mw e IP foram respectivamente iguais a 451×10^2 Da e 6,6, inferiores aos valores apresentados pelas partículas casca-núcleo de PMMA/PMMA 1h, indicando que a incorporação de partículas emulsificadas foi menor. Esse comportamento também pode estar relacionado com as massas molares das partículas formadas em emulsão, que são menores. Portanto, o benzoato de vinila altera a reatividade relativa do metacrilato de metila, afetando as propriedades das nanopartículas e da formação da casca ao redor do núcleo. O valor do IP é elevado em ambos os casos e isso se deve à combinação dos processos de polimerização, conforme verificado por LENZI (2002), LENZI *et al.* (2003) e BESTETI (2009).

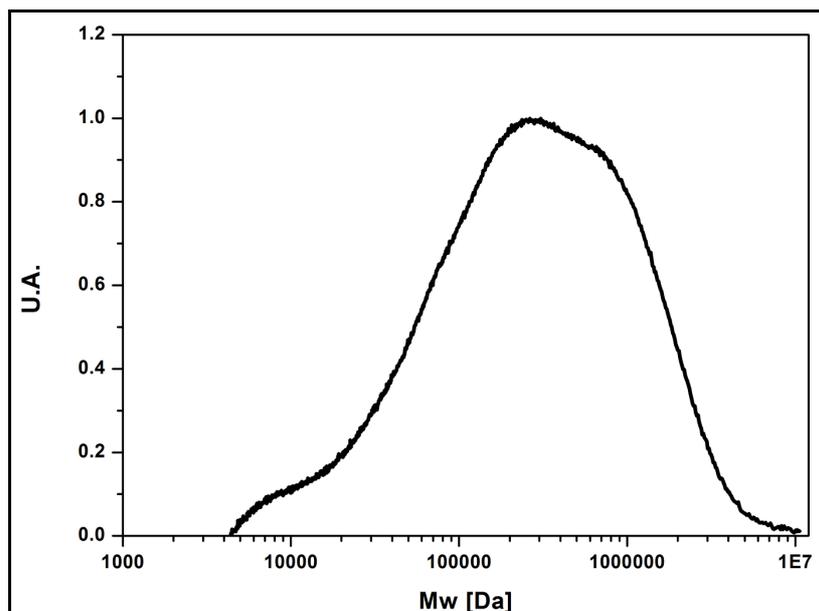


Figura 5.12: Distribuição de massas molares de PMMA/PMMA-BV.

A temperatura de transição vítrea do material produzido foi de $111,5 \pm 1,1$ °C (Apêndice B, Figura B8), que é inferior à Tg de PMMA/PMMA 1h, sendo que essa característica é um indicativo de que houve incorporação de benzoato de vinila nas cadeias de metacrilato de metila. O valor obtido foi semelhante ao do PMMA/PMMA 2h, indicando uma vez mais a relação com a massa molar.

A distribuição de tamanhos das partículas finais está ilustrada na Figura 5.13. O diâmetro médio das partículas foi de $194,2$ μm , ligeiramente inferior ao obtido com o PMMA/PMMA 1h e indicando processo similar de aglomeração.

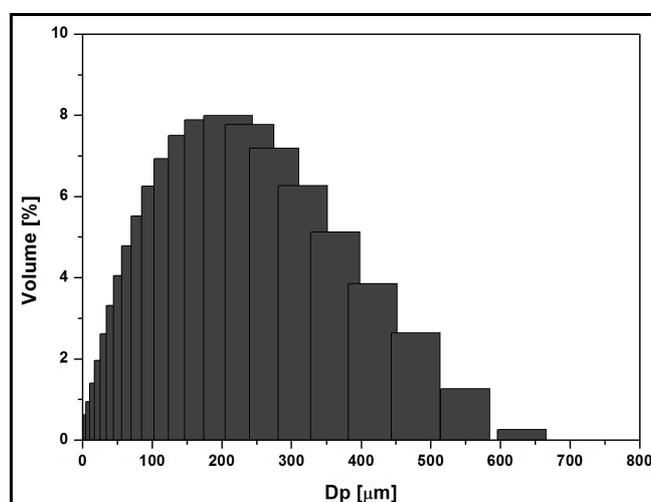


Figura 5.13: Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA/PMMA-BV.

A área específica desse material foi de $2,0 \text{ m}^2/\text{g}$ e o diâmetro médio de poro foi de $161,2 \text{ \AA}$, sendo esses valores inferiores ao encontrados em PMMA/PMMA 1h. Esse fato permite concluir que a incorporação nas nanopartículas foi influenciada pela baixa reatividade do benzoato de vinila. Novamente, não foi observada a relação entre o diâmetro das partículas emulsificadas presentes no sobrenadante com o diâmetro médio de poro. Apesar do diâmetro das partículas emulsificadas ter mudado pouco, o diâmetro dos poros foi fortemente afetado pela presença do benzoato de vinila. O ângulo de contato foi de $89,76 \pm 1,28$ e, pode-se confirmar que houve incorporação de benzoato de vinila e o respectivo aumento do grau de hidrofobicidade, como já poderia ser esperado, já que o ângulo de contato sofreu aumento considerável, quando comparado ao PMMA puro.

As partículas casca-núcleo de PMMA/PMMA-BV foram submetidas a uma reação de saponificação com hidróxido de sódio, com o objetivo de remover grupamentos de ácido benzóico e funcionalizar a partículas com grupos álcoois (por meio da substituição do anel aromático da estrutura). As micrografias desse material, denominado de PMMA/PMMA-BV SAP, estão presentes na Figura 5.14. A saponificação não provocou nenhuma alteração aparente na morfologia das partículas poliméricas, podendo-se notar a estrutura de poros do material e um recobrimento satisfatório do núcleo.

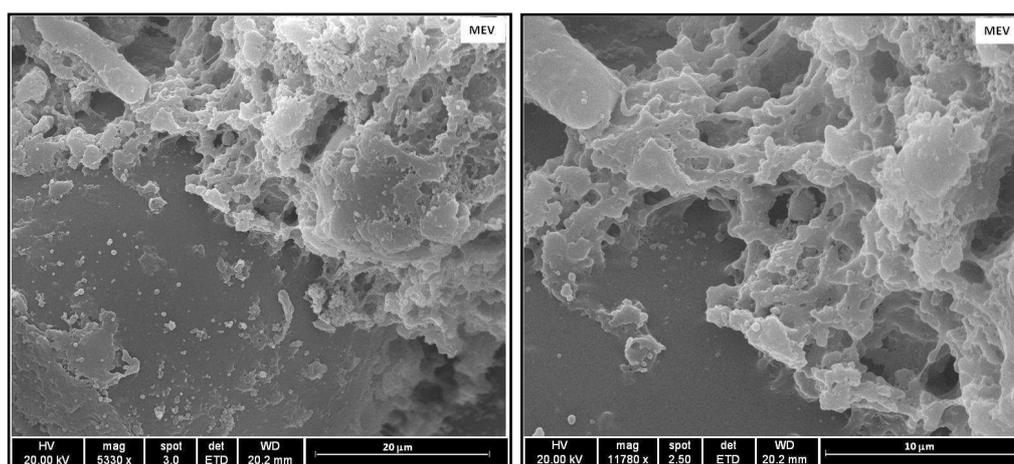


Figura 5.14: Micrografias de PMMA/PMMA-BV SAP.

A distribuição de massas molares das partículas está ilustrada na Figura 5.15. A massa molar ponderal média obtida foi igual a $383 \times 10^3 \text{ Da}$ e o índice de polidispersão

foi de 4,6. O valor de Mw foi bastante menor que o do PMMA/PMMA-BV, sendo um indicativo de que a saponificação ocorreu de forma eficiente.

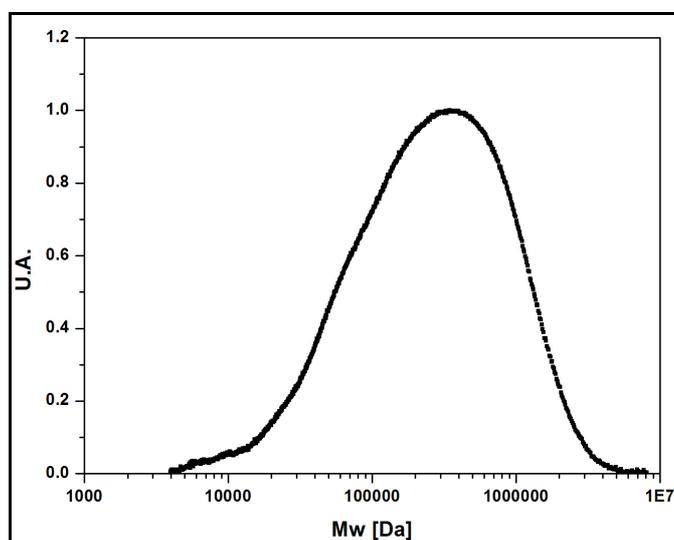


Figura 5.15: Distribuição de massas molares de PMMA/PMMA-BV SAP.

O espectro de FT-IR desse material é apresentado na Figura C3 (Apêndice C), no qual, não é possível notar a presença de bandas em torno de 3600 cm^{-1} , que indicam a presença de hidroxilas (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Isso pode ser consequência da baixa concentração de hidroxilas frente aos outros componentes do polímero e também pelo fato da saponificação não ocorrer em todo material usado na reação (ou seja, a conversão da saponificação não é de 100%). A Tg do polímero foi igual a $112,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Apêndice B, Figura B9), sendo pouco maior que a do polímero casca-núcleo sem reação de saponificação, a despeito de menor massa molar do material saponificado.

A distribuição de tamanhos das partículas está ilustrada na Figura 5.16. O diâmetro médio das partículas foi de $256,7\text{ }\mu\text{m}$, similar ao polímero original não saponificado, indicando que o processo de saponificação não induz a quebra nem a aglomeração das partículas. A área específica e o diâmetro médio de poro foram, respectivamente, iguais a $3,4\text{ m}^2/\text{g}$ e $181,9\text{ \AA}$. Ambos os valores foram superiores aos apresentados pelo material não saponificado, sendo mais um indicativo de que a saponificação ocorreu e que pode ser usada para gerar poros maiores, contribuindo para o aumento na área específica do material. O ângulo de contato foi reduzido para $78,37 \pm 11,13\text{ }^{\circ}$, indicando que a hidrofobicidade do material aumentou com a saponificação. Por

todas as razões apresentadas, pode-se dizer que a estratégia de polimerizar ésteres insaturados e fazer a saponificação posterior pode ser muito útil para preparar suportes poliméricos.

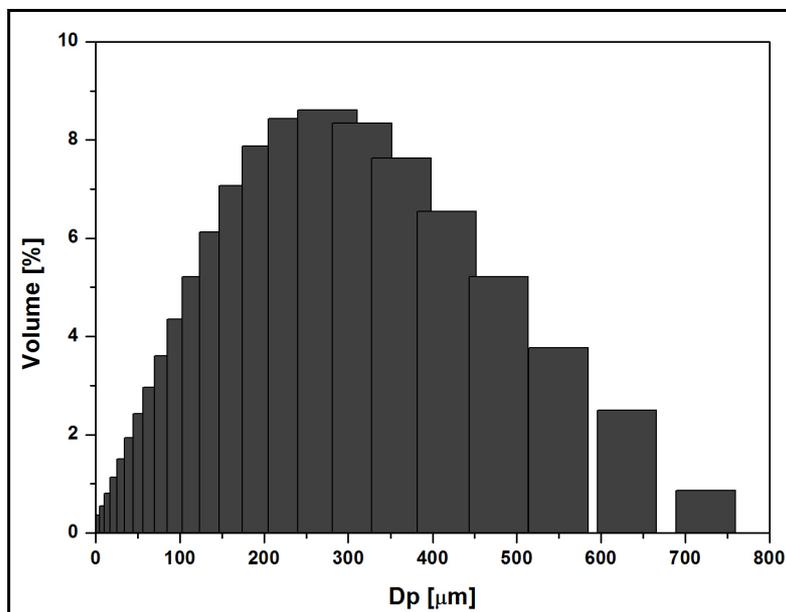


Figura 5.16: Distribuição de tamanhos de partícula de PMMA/PMMA-BV SAP.

5.3. Polímeros Casca-Núcleo Contendo Divinilbenzeno

O divinilbenzeno (DVB) é um monômero duplamente insaturado e por isso pode ser usado como agente reticulante ligando cadeias poliméricas. Essa propriedade pode influenciar consideravelmente a porosidade final do material e também a sua resistência mecânica (CHEN *et al.* 2007a; CHEN *et al.*, 2008). Nesse sentido, a adição de divinilbenzeno foi feita nos materiais com casca e núcleo de poli(estireno) (PS/PS) e com casca e núcleo de poli(metacrilato de metila) (PMMA/PMMA 2h), uma vez que a atividade enzimática após a imobilização e os parâmetros de imobilização (como será detalhado no próximo capítulo) foram satisfatórios para essas amostras. O divinilbenzeno foi adicionado só no núcleo, só na casca e no núcleo e na casca simultaneamente. Para todas essas reações, a duração da etapa de polimerização em suspensão foi de 2h e a quantidade de DVB incorporada correspondeu à 25% do total de monômero empregada na polimerização em suspensão e em emulsão. Essa quantidade de DVB é capaz de promover uma elevada reticulação do material e por isso foi adotada.

5.3.1. Núcleo de Poli(estireno-co-divinilbenzeno)

A morfologia das partículas poliméricas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (PS-DVB), oriundas da etapa de polimerização em suspensão, estão ilustradas na Figura 5.17. Pode-se notar que as partículas são perfeitamente esféricas e compactas, sem qualquer porosidade aparente e exibem uma larga distribuição de tamanhos, o que é característico de processos de polimerização em suspensão.

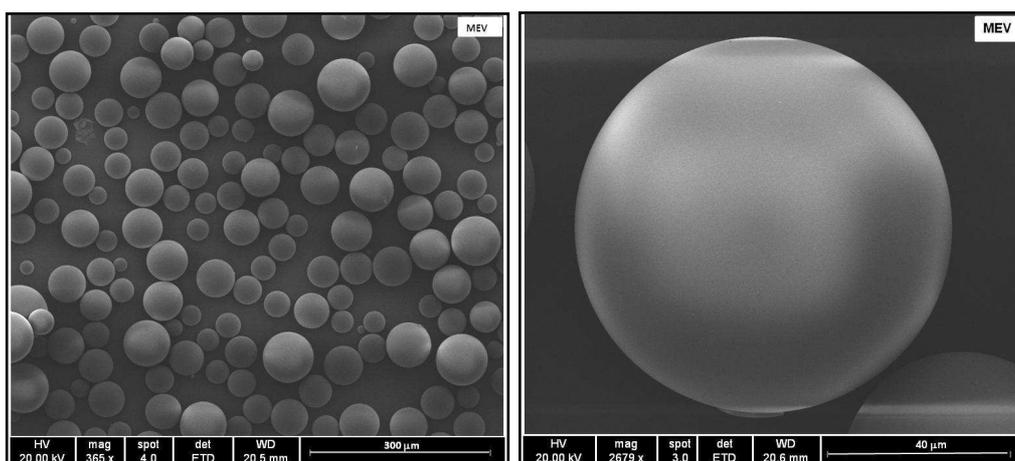


Figura 5.17: Micrografias de PS-DVB resultante da polimerização em suspensão.

A distribuição de tamanhos de partículas para desses materiais está ilustrada na Figura 5.18, apresentando-se consideravelmente larga, como é encontrado usualmente na polimerização em suspensão clássica.

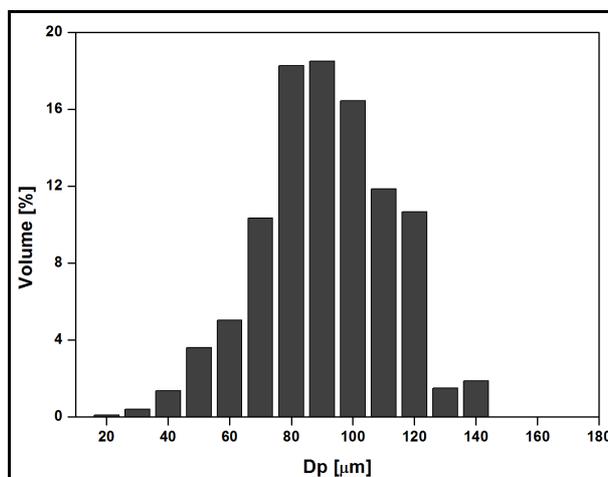


Figura 5.18: Distribuição de tamanhos de partículas de PS-DVB.

O diâmetro médio das partículas foi de 56,1 μm . Segundo BESTETI (2009), as partículas de poli(estireno) resultantes da polimerização em suspensão em condições similares apresentam diâmetro médio era 45,7 μm . Portanto, pode-se constatar que a adição de divinilbenzeno ocasionou um aumento na distribuição de tamanhos das partículas, com favorecimento dos mecanismos de coalescência e redução das taxas de quebra, provavelmente por causa do aumento das massas molares (e, conseqüentemente, da viscosidade da gota).

A trajetória dinâmica de conversão de monômero para esse material está ilustrada na Figura 5.19, sendo que a conversão alcançada foi de cerca de 90%, quando a etapa de suspensão tem duração de 2h. Esse resultado é bem similar ao apresentado por partículas de poli(estireno) (LENZI 2002, LENZI *et al.*, 2003; MELO 2009; BESTETI, 2009), indicando que a adição de divinilbenzeno não altera de forma apreciável a reatividade do monômero.

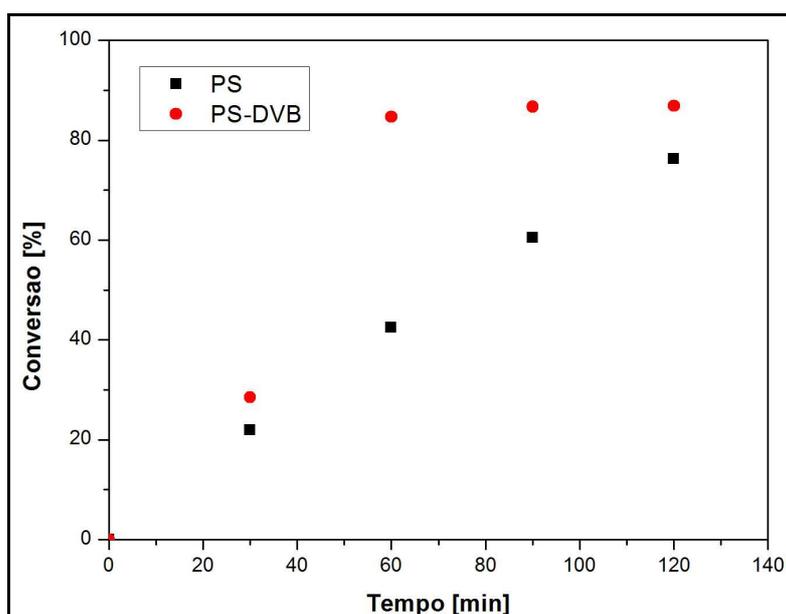


Figura 5.19: Conversão de PS-DVB e de PS.

As distribuições de massas molares das partículas de PS-DVB não puderam ser encontradas, pois o material não se dissolvia no tetrahydrofurano (THF), que é a fase móvel empregada nessas análises. Isso indica que o material apresenta-se reticulado, confirmando que a adição de divinilbenzeno foi capaz de alterar a estrutura das cadeias

poliméricas, como desejado. Esse comportamento foi observado em todos os polímeros casca-núcleo desenvolvidos, inclusive no sobrenadante de cada um deles.

5.3.1.1. Casca de poli(estireno)

O polímero com núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) e casca de poli(estireno) foi denominado de PS-DVB/PS. As micrografias desse material estão ilustradas na Figura 5.20.

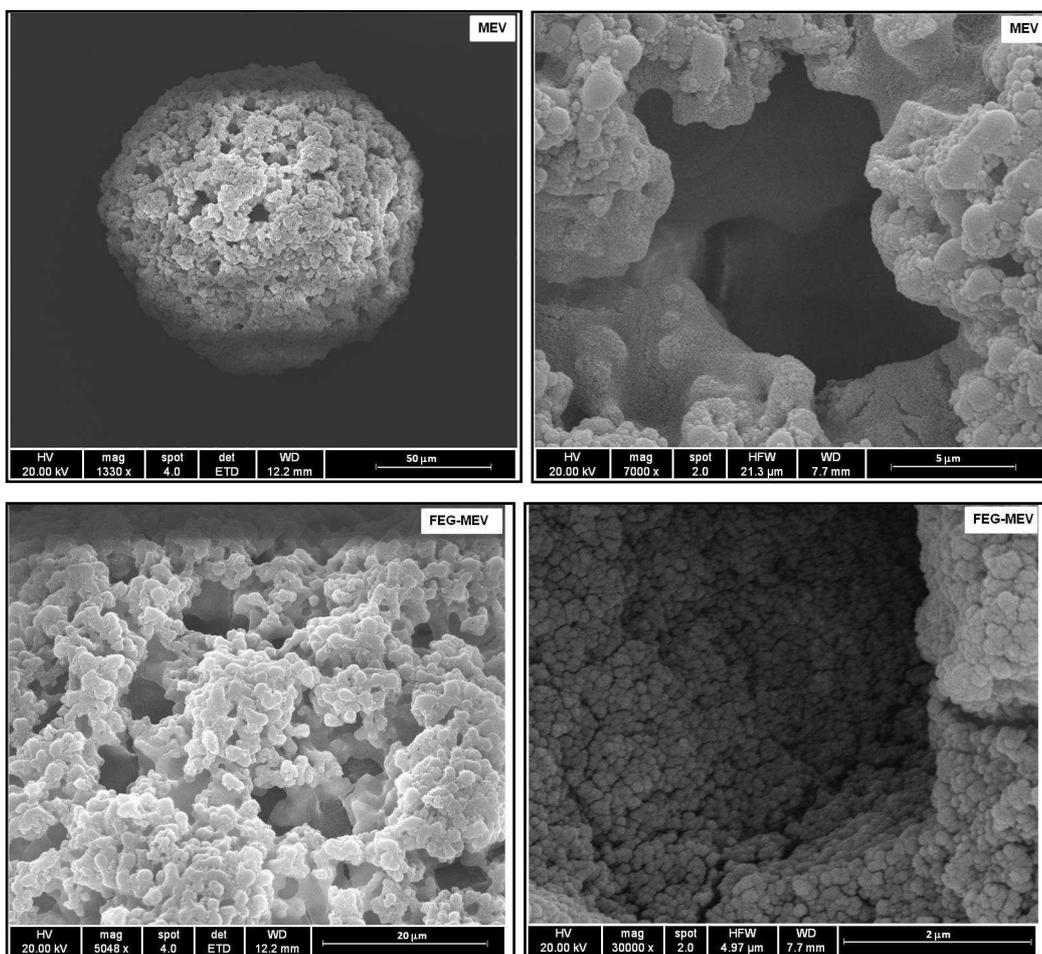


Figura 5.20: Micrografias de PS-DVB/PS.

A presença de divinilbenzeno na carga de monômero alterou consideravelmente a morfologia das partículas, quando comparadas à morfologia das partículas casca-núcleo de PS. É possível notar nas micrografias que as partículas apresentaram elevada porosidade e que ocorreu a formação de cavidades em algumas partes da casca. As micrografias nessas regiões mostram claramente a aglomeração de nanopartículas,

deixando bastante evidente o processo de formação das partículas casca-núcleo por meio da polimerização simultânea em suspensão e emulsão.

O espectro de infravermelho desse material está ilustrado na Figura C4 (Apêndice C) e apresentaram bandas de anel benzênico monossustituído (referente ao estireno) em torno de 750 cm^{-1} , enquanto que as bandas de anel benzênico dissustituído estavam em torno de $837\text{-}905\text{ cm}^{-1}$. As bandas referentes ao anel benzênico monossustituídos estão mais evidentes, por estarem presentes em maior quantidade (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Dessa forma, a copolimerização entre esses monômeros de fato ocorre. Espectros semelhantes foram obtidos para os outros materiais contendo estireno e divinilbenzeno.

O teor de sólidos no sobrenadante do meio reacional de PS-DVB/PS foi de 0,0%, não sendo, por isso, possível caracterizar o sobrenadante. Isso indica que a captura das partículas geradas pela emulsão foi bastante eficiente.

A distribuição de massas molares do polímero casca-núcleo exibiu resultados semelhantes ao polímero de PS-DVB, uma vez que a reticulação das cadeias poliméricas pelo divinilbenzeno dificulta a sua dissolução. A temperatura de transição vítrea (T_g) desse material foi igual a $100,9 \pm 0,7\text{ }^\circ\text{C}$ (Apêndice B, Figura B10), valor similar ao apresentado pelo polímero casca-núcleo de PS, que era de $98\text{ }^\circ\text{C}$ (BESTETI, 2009).

A distribuição de tamanhos de partículas de PS-DVB/PS está ilustrada na Figura 5.21. O diâmetro médio das partículas de PS-DVB/PS foi igual a $111,9\text{ }\mu\text{m}$, sendo superior ao encontrado nas partículas constituintes do núcleo (resultantes apenas da etapa de polimerização em emulsão), devido à formação da casca e aglomeração de núcleos, como nos demais casos. Em comparação ao PS casca-núcleo (diâmetro médio de $192,5\text{ }\mu\text{m}$), a distribuição de tamanhos foi mais estreita (BESTETI, 2009), indicando que o processo de aglomeração foi menos pronunciado.

A área específica das partículas de PS-DVB/PS foi igual a $10,9\text{ m}^2/\text{g}$ e o diâmetro médio de poro foi de $185,9\text{ \AA}$. Os valores de área específica e diâmetro médio

de poro de PS casca-núcleo foram iguais, respectivamente, a $7,9 \text{ m}^2/\text{g}$ e $218,8 \text{ \AA}$ (BESTETI, 2009). Isso confirma que a presença de divinilbenzeno altera a porosidade do material. A diminuição do diâmetro médio de poro é consequência provável da maior eficiência da captura das partículas formadas em emulsão.

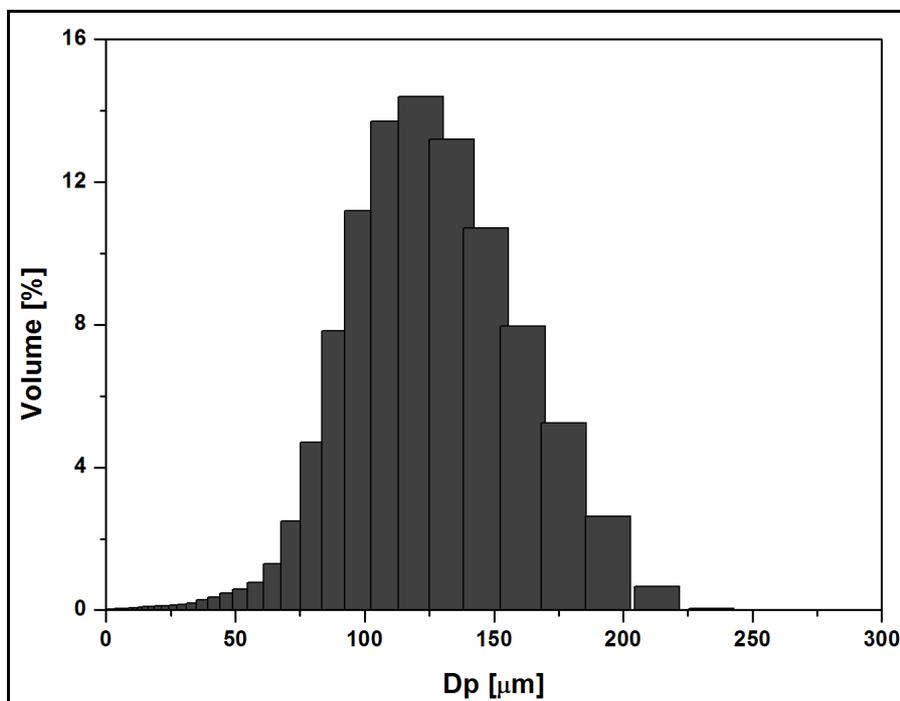


Figura 5.21: Distribuição de tamanhos de partículas de PS-DVB/PS.

Em função da modificação da morfologia causada pelo divinilbenzeno, a massa específica desse material foi avaliada. Partículas casca-núcleo de poli(estireno) apresentaram massa específica de $0,95 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$, enquanto que as partículas de PS-DVB/PS apresentaram massa específica de $1,06 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$. Apesar da morfologia do PS-DVB/PS ser aparentemente mais porosa que a do PS/PS, o aumento de densidade reflete maior compactação do núcleo e das cadeias poliméricas. Na prática, o aumento da densidade é benéfico para aplicação em suspensões aquosas. Os polímeros PS/PS e PS-DVB/PS têm ângulo de contato, respectivamente, iguais a $90,89 \pm 4,26^\circ$ e $87,09 \pm 1,15^\circ$. Assim, pode-se concluir que a adição de DVB não modificou a hidrofobicidade das partículas poliméricas. Todos os resultados indicam que a adição de DVB ao meio reacional pode ser extremamente vantajoso para a produção de suportes enzimáticos.

5.3.1.2. Casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno)

As micrografias das partículas com núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) e casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno) (PS-DVB/PS-DVB) estão ilustradas na Figura 5.22.

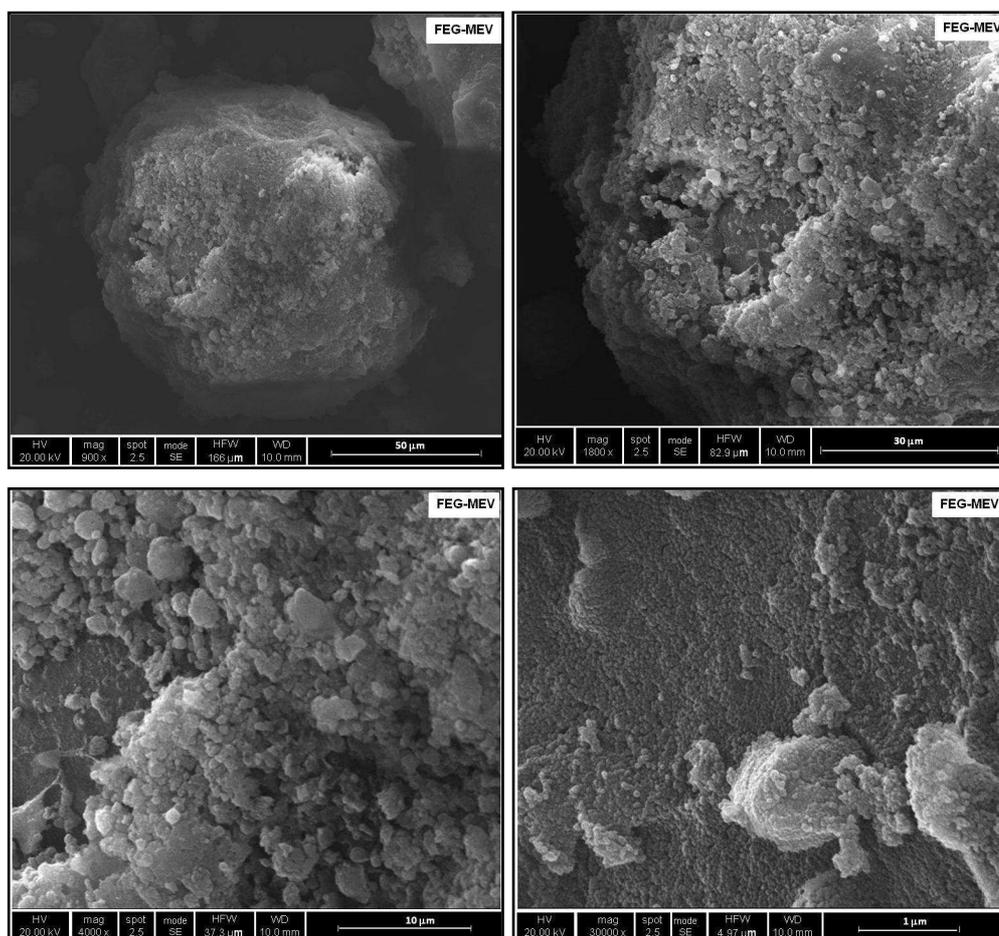


Figura 5.22: Micrografias de PS-DVB/PS-DVB.

Conforme ilustrado nas micrografias da Figura 5.22, as partículas contendo divinilbenzeno no núcleo e na casca apresentam elevada porosidade aparente. Como há maior quantidade de DVB (correspondente ao núcleo e a casca), as partículas são ainda mais compactas e bem formadas. As micrografias ilustram a deposição de nanopartículas em camadas

O teor de sólidos e o diâmetro médio das partículas emulsificadas presentes no sobrenadante foram iguais, respectivamente, a $0,93 \pm 0,03\%$ e $461,5 \pm 10,6$ nm

(Apêndice A, Figura A4). A quantidade de partículas presentes no sobrenadante ao final da polimerização simultânea em suspensão e emulsão revelou um baixo teor de sólidos indicando que houve uma boa incorporação das nanopartículas presentes no sobrenadante. Esse valor foi menor que o apresentado pelas partículas de PS casca-núcleo (cujo teor de sólidos foi igual a 1,5%, segundo BESTETI (2009)) e um pouco maior que o exibido pelas partículas de PS-DVB/PS. Esse fato está provavelmente associado à maior fluidez das partículas de PS emulsificadas, que podem ser capturadas com maior eficiência que as nanopartículas reticuladas. Essa análise é corroborada pelo diâmetro elevado das partículas presentes no sobrenadante. A Tg do material obtido foi igual a 100,9 °C (Apêndice B, Figura B11), indicando um pequeno aumento em relação à do poli(estireno) puro.

A distribuição de tamanhos de partículas está ilustrada na Figura 5.23. O diâmetro médio das partículas poliméricas foi igual a 87,0 μm . Esse valor é superior ao apresentado pelo núcleo de PS-DVB e inferior ao das partículas de PS-DVB/PS. Isso parece confirmar que a aglomeração da casca de PS é mais eficiente que da casca de PS-DVB. Como o valor do teor de sólidos das partículas contendo divinilbenzeno apenas no núcleo é menor, a casca apresenta uma maior quantidade de material, o que também influencia no tamanho final das partículas. Além disso, essas partículas são mais compactadas que as de PS casca-núcleo, contribuindo com a redução aparente dos diâmetros (BESTETI, 2009).

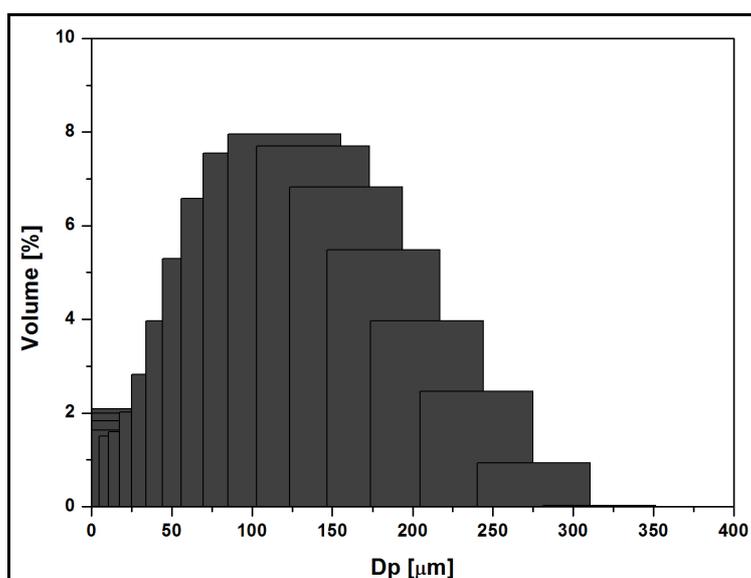


Figura 5.23: Distribuição de tamanhos de partículas de PS-DVB/PS-DVB.

O valor da área específica obtida nesse caso foi de 28,9 m²/g, enquanto o diâmetro médio de poro foi igual a 190,4 Å. Quanto maior foi a quantidade de divinilbenzeno adicionado durante as etapas da polimerização simultânea em suspensão e emulsão, maior foi a área específica final do material. O diâmetro de poro apresentou uma redução em relação ao diâmetro das partículas de PS casca-núcleo, em função do melhor empacotamento das nanopartículas capturadas.

A massa específica das partículas contendo divinilbenzeno no núcleo e na casca foi de 0,99 ± 0,03 g/cm³. Apesar da adição do agente reticulante e do aumento da área específica do material, a massa específica não foi menor que a apresentada pelas partículas contendo apenas poli(estireno). O ângulo de contato desse material foi de 87,75 ± 0,81°, de maneira que não houve modificação significativa da hidrofobicidade após a adição de divinilbenzeno.

5.3.2. Núcleo de Poli(estireno)

As partículas poliméricas de poli(estireno) (PS) resultantes de uma polimerização em suspensão foram caracterizadas por BESTETI (2009). Essas partículas apresentam forma perfeitamente esférica, uma larga distribuição de tamanhos e o diâmetro médio de 45,7 µm. A conversão alcançada após 2h foi de cerca de 75% (BESTETI, 2009). A distribuição de massas molares está ilustrada na Figura 5.24.

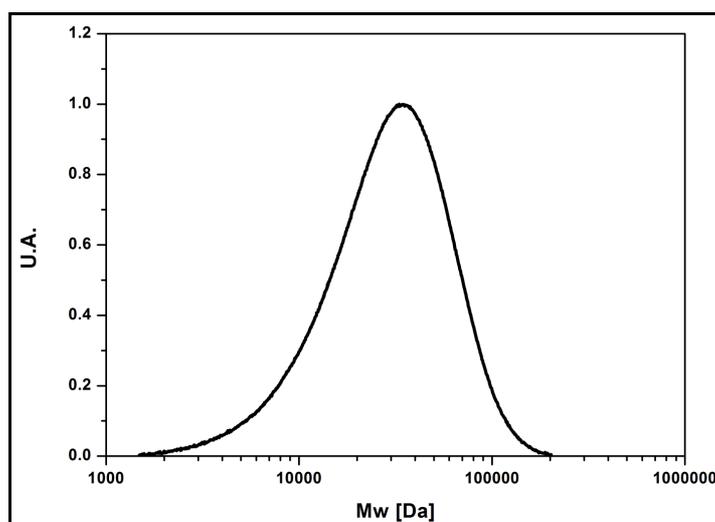


Figura 5.24: Distribuição de massas molares de PS resultante da polimerização em suspensão.

A massa molar ponderal média (M_w) foi igual a 35×10^3 Da e o índice de polidispersão (PI) é de 1,7. Esses valores são característicos de processos de polimerização em suspensão de estireno (ODIAN, 2004).

5.3.2.1. Casca de Poli(estireno-co-divinilbenzeno)

As micrografias do material contendo núcleo de poli(estireno) e casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno), denominados de PS/PS-DVB, estão ilustradas na Figura 5.25. Pode-se notar, que as partículas do núcleo estão perfeitamente recobertas e que a porosidade aparente do material é bastante satisfatória.

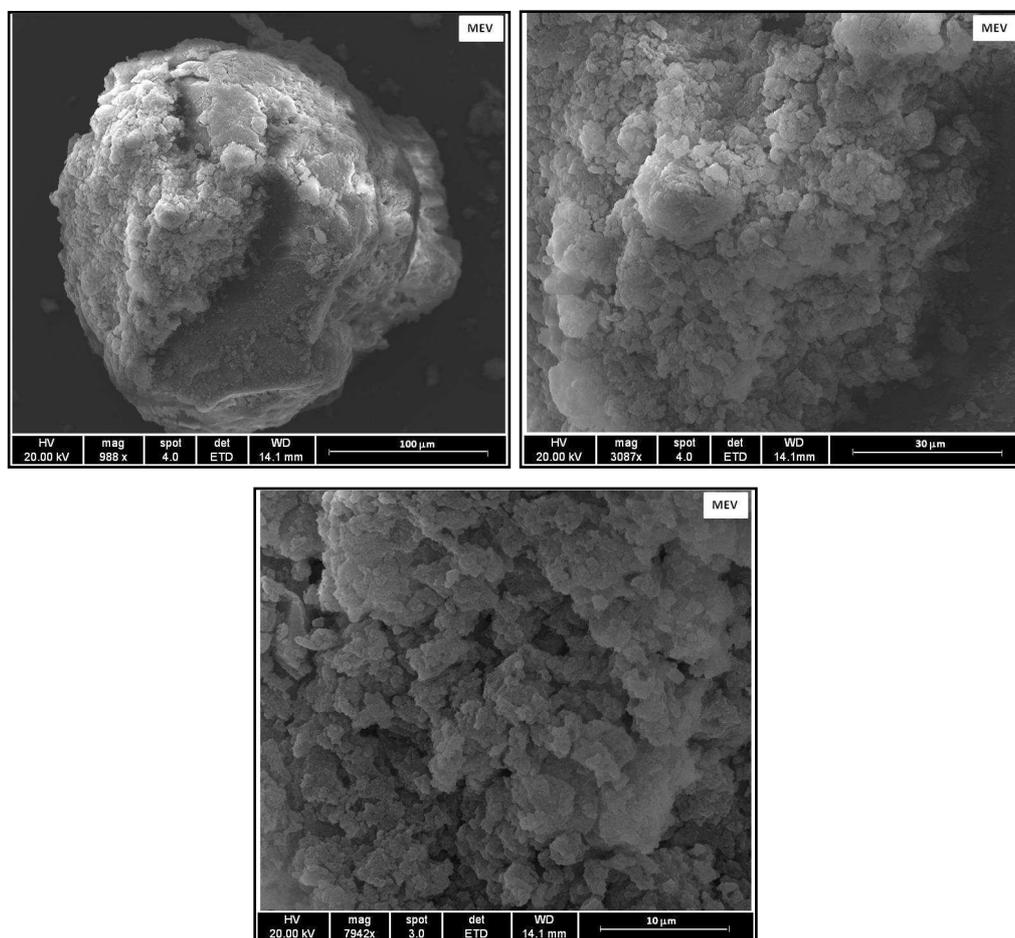


Figura 5.25: Micrografias de PS/PS-DVB.

O teor de sólidos no sobrenadante foi igual a $4,10 \pm 0,03\%$ e o diâmetro médio das partículas presentes no sobrenadante foi de $288,2 \pm 1,9$ nm (Apêndice A, Figura

A5). Vê-se que o núcleo de PS captura as partículas emulsificadas com menor eficiência, como nos demais casos.

A Tg do material obtido foi de $100,5 \pm 0,4$ °C (Apêndice B, Figura B12), valor similar ao encontrado nos outros polímeros preparados com divinilbenzeno. A distribuição de tamanhos de partículas está ilustrada na Figura 5.26. O diâmetro médio das partículas casca-núcleo foi de $119,9$ μm , com distribuição bastante alargada em relação ao núcleo de PS-DVB. Isso parece confirmar que a adição de DVB ao núcleo e/ou à casca previne a aglomeração dos núcleos e resulta em partículas menores.

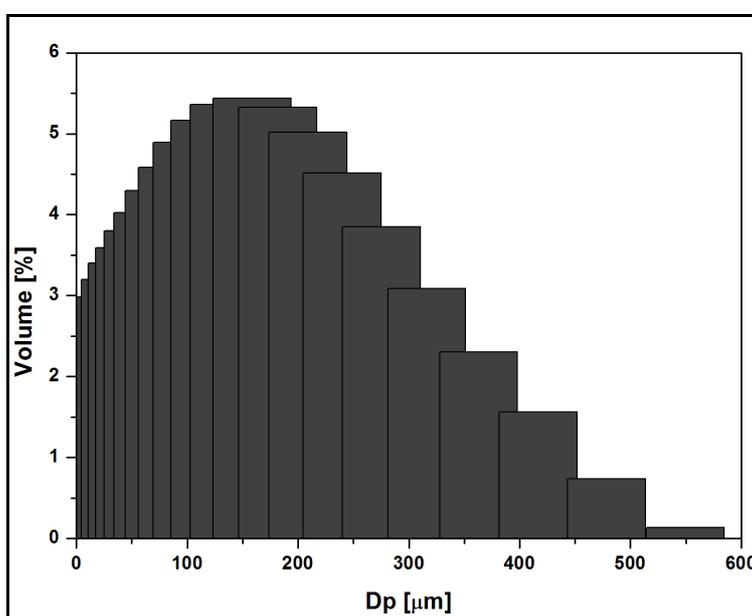


Figura 5.26: Distribuição de tamanhos de partículas de PS/PS-DVB.

A área específica e o diâmetro médio de poros foram, respectivamente, iguais a $9,5$ m^2/g e $185,5$ Å. Novamente, pode-se perceber que a presença de DVB altera consideravelmente a morfologia das partículas casca-núcleo. Comparando esses valores com os apresentados anteriormente, pode-se constatar que a presença de divinilbenzeno no núcleo gera valores de área específica muito maiores, talvez por prevenir a aglomeração dos núcleos.

A massa específica das partículas de PS/PS-DVB foi igual a $1,03 \pm 0,02$ g/cm^3 , valor similar ao apresentado nos casos anteriores, indicando que a adição de DVB afeta favoravelmente a densidade final do material. O ângulo de contato obtido foi de $85,96 \pm$

0,64°. Esse valor é ligeiramente inferior aos encontrados nas outras amostras que continham divinilbenzeno, sem razão aparente.

5.3.3. Núcleo de Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno)

A influência do agente reticulante divinilbenzeno também foi avaliada em polímeros à base de poli(metacrilato de metila). As micrografias de partículas de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) (PMMA-DVB), oriundas da etapa de polimerização em suspensão são apresentadas na Figura 5.27. Observa-se a mesma morfologia compacta e bem formada dos núcleos.

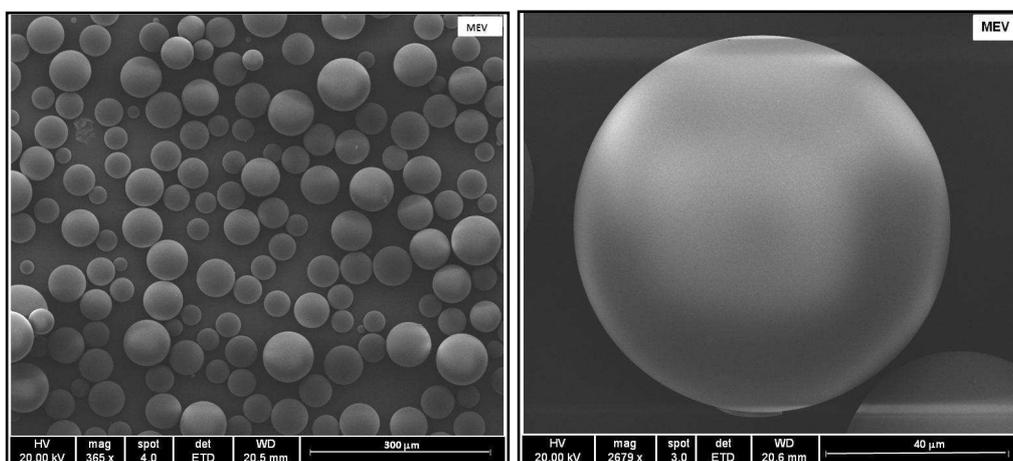


Figura 5.27: Micrografias de PMMA-DVB.

A distribuição de tamanhos de partículas está ilustrada na Figura 5.28.

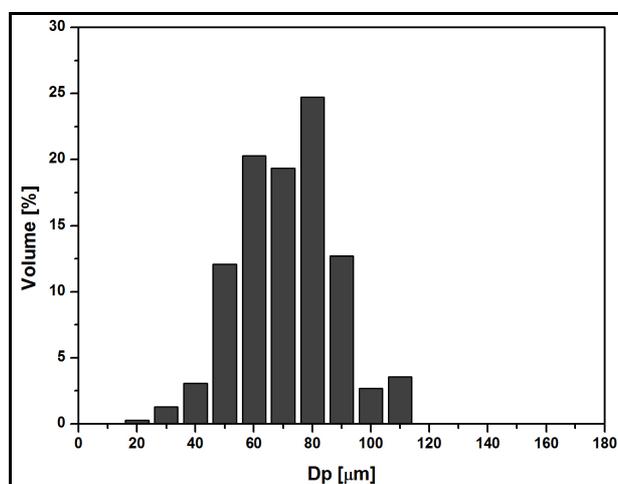


Figura 5.28: Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA-DVB.

As partículas poliméricas apresentam uma larga distribuição de tamanhos, que é característico dos processos de polimerização em suspensão. O diâmetro médio obtido foi de 48,2 μm . O diâmetro médio das partículas resultantes de uma polimerização em suspensão de PMMA foi igual a 60,5 μm (BESTETI, 2009). A adição de DVB provocou uma diminuição nos tamanho final das partículas. Esse resultado provavelmente é devido à modificação dos balanços das taxas de quebra e coalescência, em função das modificações das características reológicas e cinéticas do meio reacional.

A trajetória dinâmica da reação de polimerização dos núcleos de PMMA-DVB é mostrada na Figura 5.29. Ao final de 2h de reação a conversão encontrada ficou em torno de 90%. Comparada à polimerização do PMMA, a adição de DVB não altera significativamente a reatividade do metacrilato de metila.

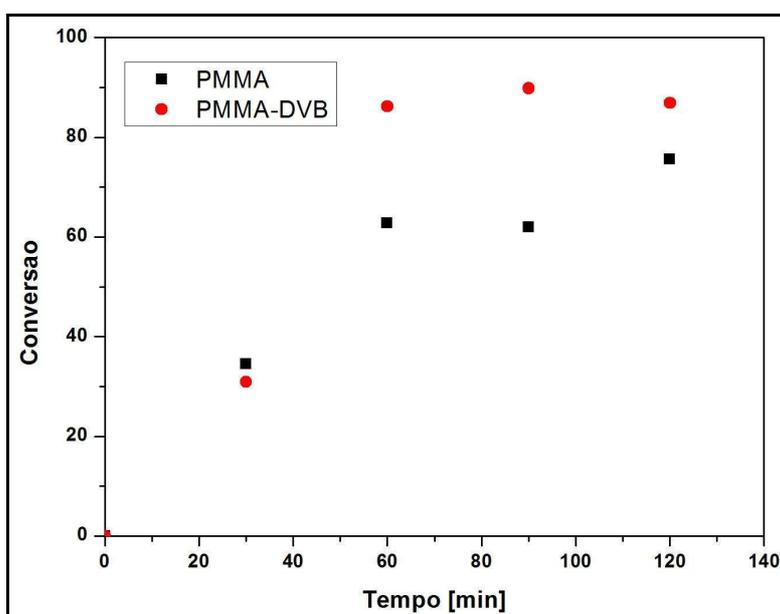


Figura 5.29: Conversão de PMMA-DVB e de PMMA.

5.3.3.1. Casca de Poli(metacrilato de metila)

As micrografias dos polímeros contendo núcleo de poli(metacrilato de metilaceto-divinilbenzeno) e casca de poli(metacrilato de metila) estão ilustradas na Figura 5.30. O núcleo encontra-se satisfatoriamente recoberto e nota-se a formação de uma estrutura bastante porosa, com a deposição de nanopartículas geradas pela polimerização em emulsão.

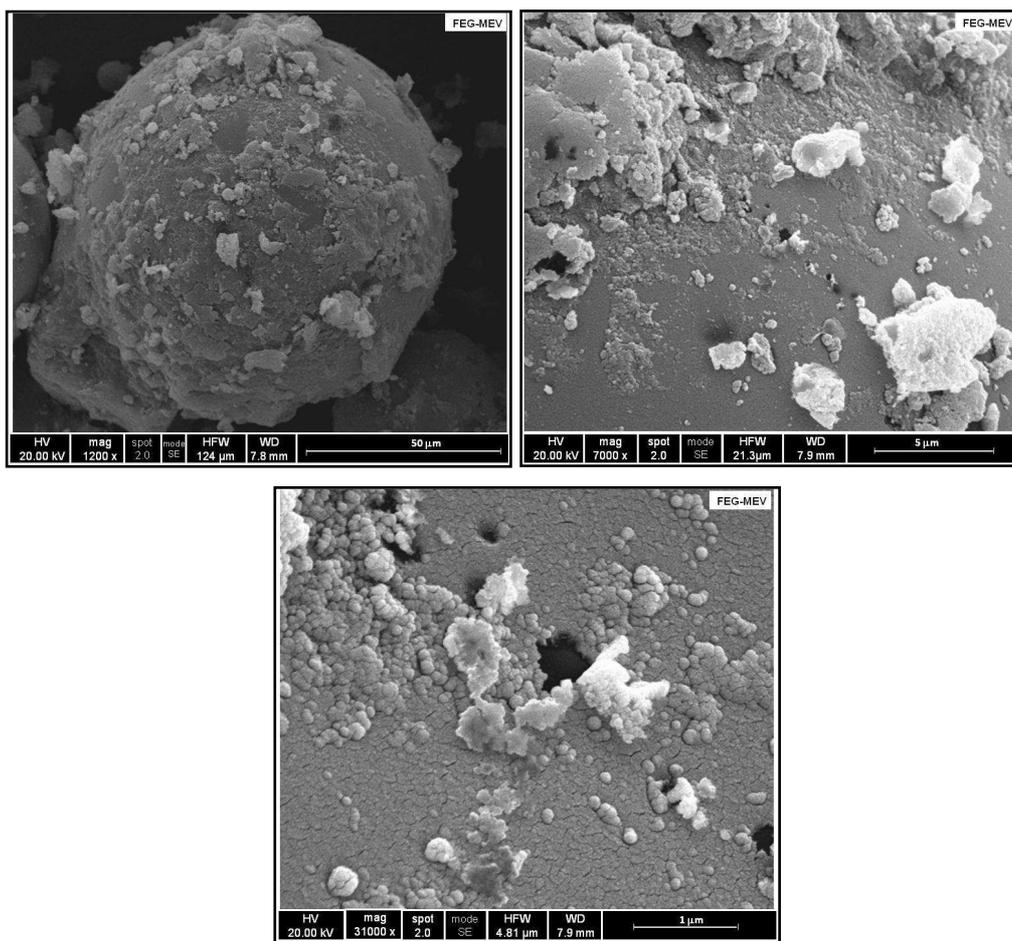


Figura 5.30: Micrografias de PMMA-DVB/PMMA.

O teor de sólidos e o diâmetro médio das partículas emulsificadas presentes no sobrenadante foram iguais a $12,91 \pm 0,01\%$ e $122,6 \pm 1,3$ nm (Apêndice A, Figura A6), respectivamente. Em relação ao PMMA casca-núcleo, cujo teor de sólidos foi igual a 5,3% como demonstrado anteriormente, houve um aumento da quantidade de nanopartículas presentes no sobrenadante. A maior quantidade de partículas no sobrenadante reflete a maior solubilidade do MMA na água e a menor compatibilidade do PMMA com a estrutura do núcleo, mais hidrofóbico e menos polar.

A temperatura de transição vítrea do PMMA-DVB/PMMA foi igual a $121,3 \pm 3,7$ °C (Apêndice B, Figura B13). Houve aumento pronunciado no valor da T_g, quando comparado ao poli(metacrilato de metila) casca-núcleo (cuja T_g é de 113,4 °C), provavelmente resultante do processo de reticulação.

A distribuição de tamanhos de partículas está ilustrada na Figura 5.31.

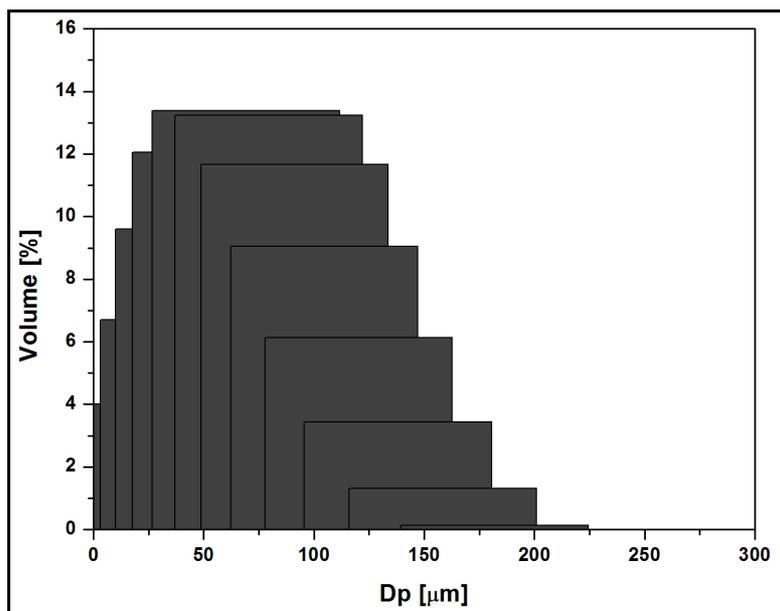


Figura 5.31: Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA-DVB/PMMA.

O diâmetro médio das partículas de PMMA-DVB/PMMA foi igual a 73,2 μm , indicando que houve a formação da casca e aglomeração de núcleos, uma vez que esse valor é superior ao apresentado pelos núcleos de PMMA-DVB. Comparando-se com PMMA/PMMA 2h, o diâmetro médio, devido à aglomeração de núcleos menos pronunciada pela presença de DVB.

A área específica das partículas produzidas foi de 8,7 m^2/g e o diâmetro médio do poro foi igual a 191,4 Å. Houve um aumento nos valor de área específica, quando comparada à do PMMA casca-núcleo, e uma diminuição do diâmetro de poro, como no caso da reação de estireno. A presença de DVB aumenta a área específica por ocasionar o empacotamento das nanopartículas de polímero, de forma mais eficiente, levando a um diâmetro de poro menor.

As massas específicas do PMMA casca-núcleo e do PMMA-DVB/PMMA foram respectivamente, iguais a $1,15 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$ e $1,14 \pm 0,07 \text{ g/cm}^3$, podendo-se perceber que a adição de divinilbenzeno não alterou a densidade do polímero. Como as massas específicas das partículas de PMMA já é mais elevada, o efeito da reticulação parece ser menos pronunciado. Não foi possível determinar o ângulo de contato dessas partículas poliméricas, já que não se conseguiu formar a pastilha desse polímero. Em todas as tentativas, após ser retirada da prensa, a pastilha se deformava completamente e gerava

um pó, o que impossibilitava o prosseguimento da análise. Isso mostra que a presença de DVB altera a adesividade do material, em função da menor polaridade desse monômero.

5.3.3.2. Casca de Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno)

O polímero com núcleo de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) e casca de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) (PMMA-DVB/PMMA-DVB) está ilustrado na Figura 5.32. Pode-se perceber que as partículas geradas são consideravelmente porosas e que a presença do agente reticulante altera consideravelmente a sua morfologia.

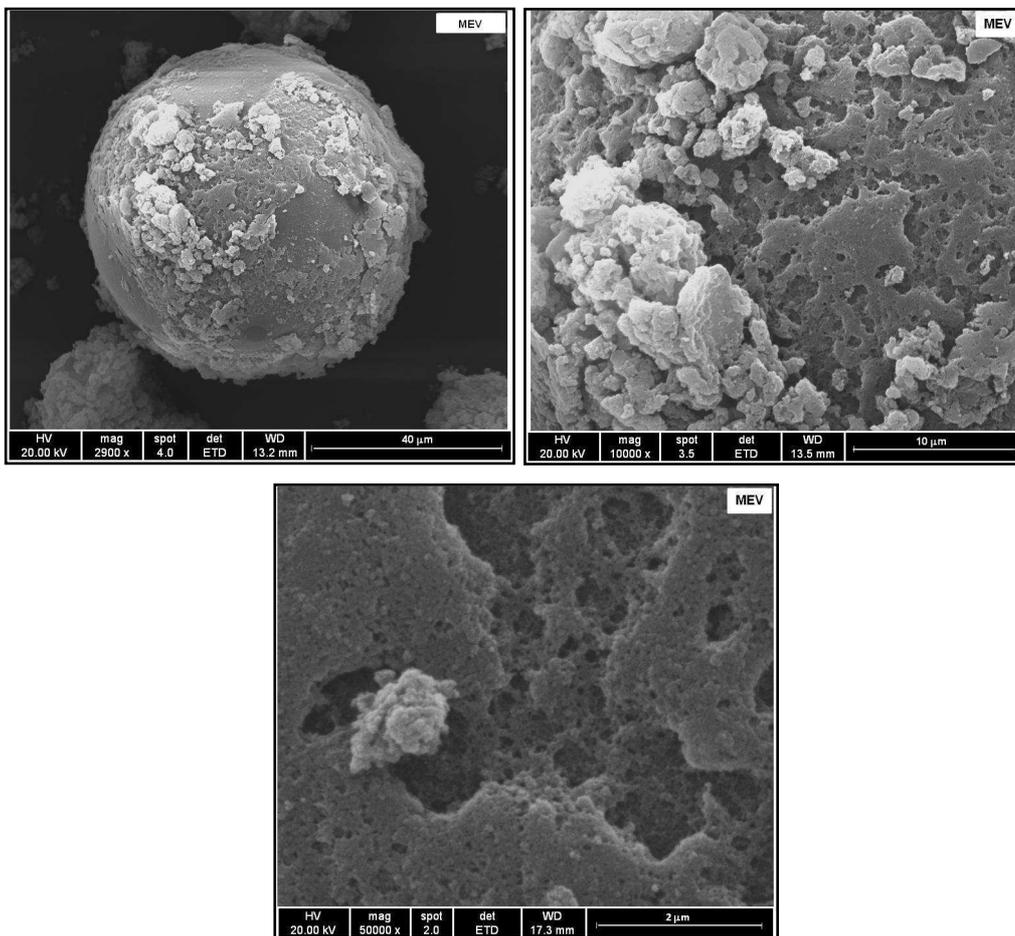


Figura 5.32: Micrografias de PMMA-DVB/PMMA-DVB.

O teor de sólidos no sobrenadante foi igual a $13,72 \pm 0,08\%$, enquanto o diâmetro médio das partículas emulsificadas foi igual a $85,5 \pm 0,7$ nm (Apêndice A, Figura A7). Em relação ao PMMA casca-núcleo, houve um aumento novamente no teor de sólidos, indicando que a polimerização do metacrilato de metila com o agente reticulante resulta em captura menos eficiente de nanopartículas emulsificadas, por causa da menor compatibilidade entre MMA e DVB.

A Tg do polímero casca-núcleo produzido foi de $103,9$ °C (Apêndice B, Figura B14), ainda menor que o valor exibido pelo polímero PMMA-DVB/PMMA. Acredita-se que isso ocorra em virtude da desorganização cristalina do PMMA com a copolimerização do MMA com o DVB.

O diâmetro médio das partículas foi de $45,0$ μm e a distribuição de tamanhos de partículas é apresentada na Figura 5.33. Pode-se notar que a distribuição de tamanhos é larga, em decorrência da formação da casca e de aglomeração de núcleos. Esse diâmetro médio é menor que o apresentado pelas partículas de PMMA/PMMA 2h, indicando que a copolimerização com DVB previne a aglomeração de núcleos.

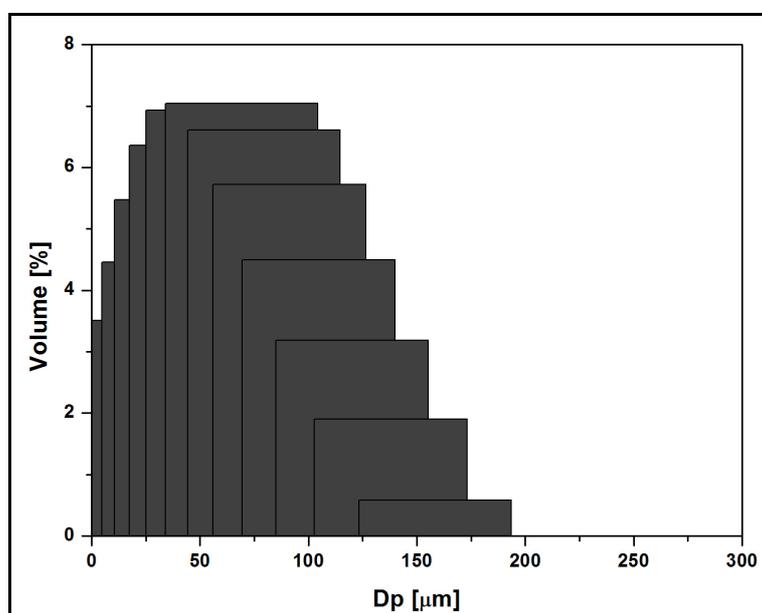


Figura 5.33: Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA-DVB/PMMA-DVB.

A área específica e o diâmetro médio de poro foram, respectivamente, iguais a $12,6$ m^2/g e $193,4$ Å. O valor do diâmetro de poro foi similar ao apresentado pelo

polímero casca-núcleo contendo DVB apenas no núcleo. Já a área específica apresentou um aumento, provavelmente pela maior eficiência de captura das partículas emulsificadas e melhor empacotamento das nanopartículas da casca.

A massa específica apresentada por essas partículas casca-núcleo foi de $1,17 \pm 0,02 \text{ g/cm}^3$, sendo próxima dos valores exibidos pelo PMMA/PMMA 2h e por PMMA-DVB/PMMA, apesar da maior área específica. Similarmente ao ocorrido com o polímero PMMA-DVB/PMMA, não foi possível determinar o ângulo de contato dessas partículas.

Os resultados indicam uma vez mais que a adição de DVB ao sistema reacional pode ser útil para a produção de suportes enzimáticos. Apesar disso, a baixa compatibilidade entre os polímeros formados por MMA e DVB afeta o processo de formação e caracterização da casca.

5.3.4. Núcleo de Poli(metacrilato de metila)

Partículas poliméricas resultantes de uma polimerização em suspensão de metacrilato de metila, com duração de 2h, foram caracterizadas na Seção 5.2. Para o núcleo de poli(metacrilato de metila), a casca produzida teve a composição apenas de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno), uma vez que partículas de PMMA/PMMA já haviam sido estudadas por BESTETI (2009).

5.3.4.1. Casca de Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno)

As partículas poliméricas contendo núcleo de poli(metacrilato de metila) e casca de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno), denominadas de PMMA/PMMA-DVB estão ilustradas na Figura 5.34. A presença de divinilbenzeno permite que as partículas tornem-se bastante porosas, havendo o completo recobrimento do núcleo pelas partículas geradas pela polimerização em emulsão.

O espectro de infravermelho do PMMA-DVB/PMMA está ilustrado na Figura C5 (Apêndice C). Comprando-se com o espectro do PMMA puro (Figura C1), nota-se a

presença de bandas em $799,3\text{ cm}^{-1}$, referentes ao anel benzênico dissustituído (SILVERSTEIN *et al.*, 2005). Isso comprova que houve a incorporação do DVB na estrutura do copolímero. Espectros semelhantes foram obtidos para os outros polímeros com essa composição.

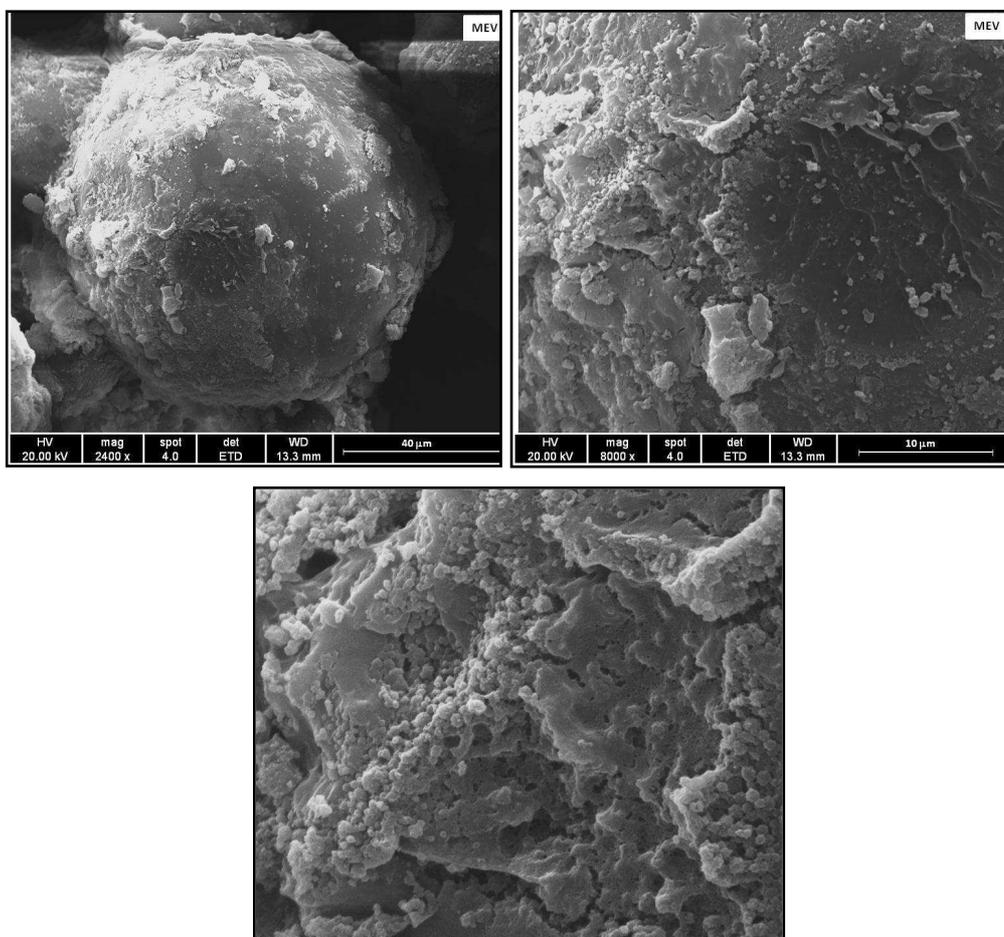


Figura 5.34: Micrografias de PMMA/PMMA-DVB.

O teor de sólidos no sobrenadante ao final da reação é de $10,38 \pm 0,64\%$ e o diâmetro médio das partículas emulsificadas foi de $197,4 \pm 1,8\text{ nm}$ (Apêndice A, Figura A8). O teor de sólidos obtido foi menor que o encontrado quando apenas o núcleo do polímero casca-núcleo continha divinilbenzeno. Isso é provavelmente decorrente da menor hidrofiliçidade das partículas de PMMA-DVB preparadas em emulsão. Curiosamente, em todos os casos, as partículas capturadas no sobrenadante tinham diâmetros médios semelhantes.

A Tg das partículas foi igual a $123,4 \pm 1,2$ °C (Apêndice B, Figura B15), que é similar ao valor encontrado em PMMA-DVB/PMMA e superior ao das partículas casca-núcleo contendo apenas PMMA, indicando que o deslocamento da Tg foi devido à reticulação induzida pelo DVB. A distribuição de tamanhos de partículas está ilustrada na Figura 5.35. O diâmetro médio foi de $41,0$ μm e há um alargamento na distribuição, devido à aglomeração dos núcleos. Esse diâmetro foi inferior ao exibido pelas partículas de PMMA/PMMA 2h, indicando uma vez mais que o DVB previne a aglomeração dos núcleos.

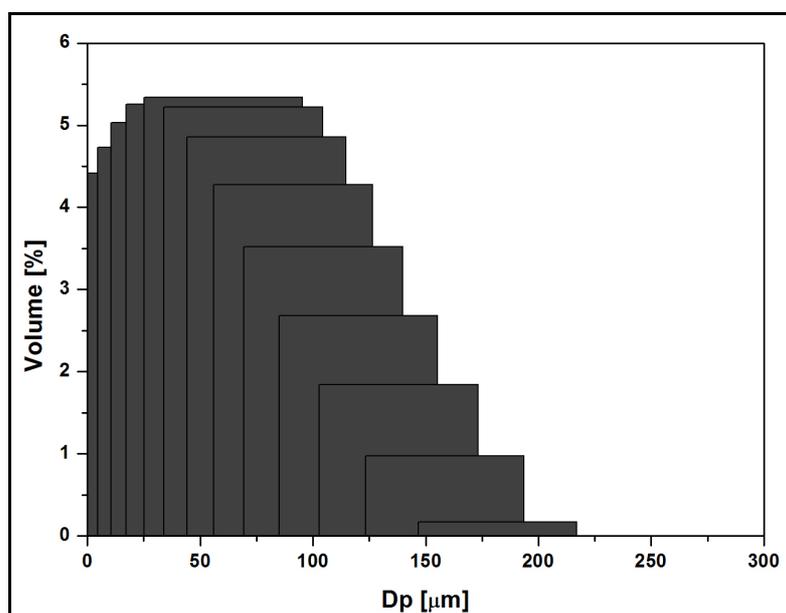


Figura 5.35: Distribuição de tamanhos de partículas de PMMA/PMMA-DVB.

As partículas casca-núcleo contendo divinilbenzeno apenas na casca apresentam área específica de $11,3$ m^2/g e diâmetro médio de poro de $144,3$ Å. Novamente, pode-se constatar que a presença de DVB aumenta consideravelmente a área específica final das partículas.

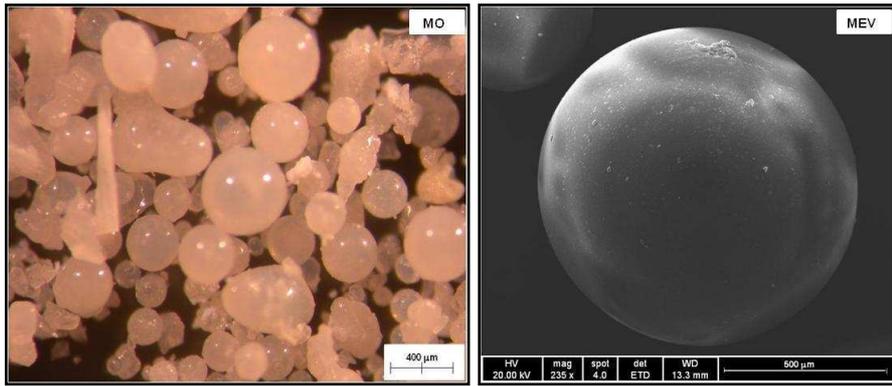
As massas específicas das partículas obtidas foi de $1,10 \pm 0,03$ g/cm^3 , sendo um pouco inferior ao valor exibido pelas partículas casca-núcleo de PMMA e também pelos outros materiais contendo PMMA e DVB. O ângulo de contato encontrado foi de $68,44 \pm 0,49$ °, sendo inferior ao do PMMA/PMMA 2h, que foi de $75,67 \pm 0,83$. Não há razão aparente para a diminuição desse valor.

5.4. Polímeros Casca-Núcleo Contendo Acetato de Vinila e Metacrilato de Metila

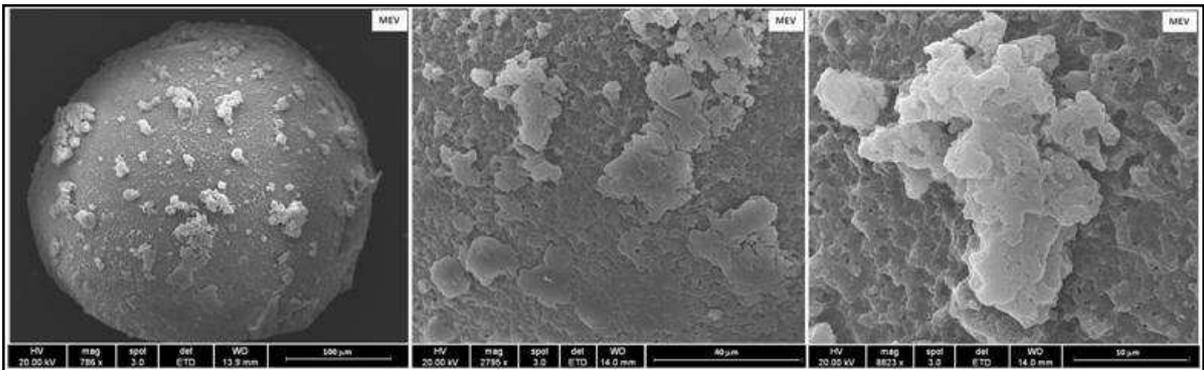
BESTETI (2009) demonstrou que a formação da casca porosa em partículas casca-núcleo está diretamente relacionada com a temperatura de transição vítrea do material constituinte da casca, sendo que a T_g deve ser superior à temperatura do meio reacional. Quando a T_g era inferior à temperatura de reação, a casca formada se depositava sobre o núcleo na forma de um filme. Esse comportamento foi observado em partículas com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila) (PS/PVAc-PMMA) e de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) (PS/PVAc-PMMA), sendo que a porcentagem de PMMA na composição da casca era de 30%.

A T_g do poli(acetato de vinila) está na faixa de 28-31 °C e a do poli(metacrilato de metila) fica em torno de 104 °C. Nesse sentido, o objetivo principal dessa seção é avaliar as características de partículas casca-núcleo com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila), variando a porcentagem de MMA adicionado à composição da casca. Como já demonstrado, as partículas casca-núcleo de PS/PMMA formam uma casca porosa ao redor do núcleo. A duração da etapa de suspensão foi sempre de 2h e a quantidade de MMA adicionado variou de 40 a 90% do total de monômero empregado na etapa de polimerização em emulsão.

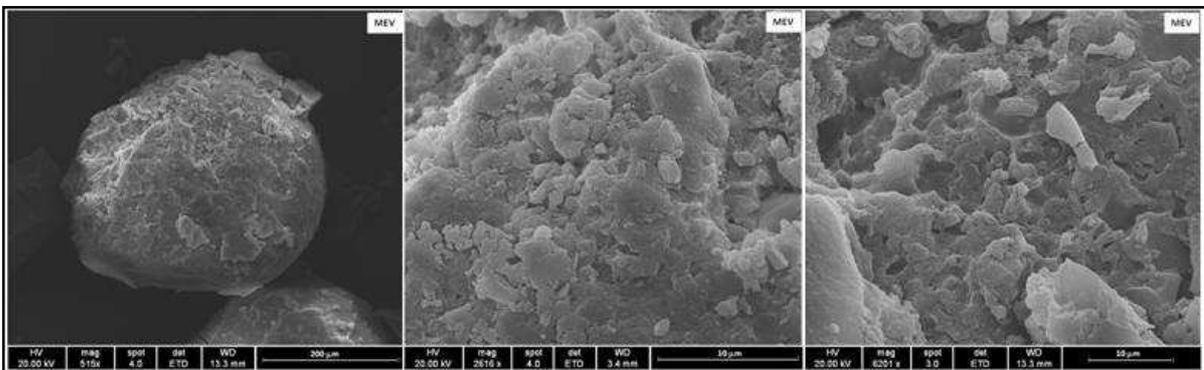
As micrografias de polímeros casca-núcleo com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila), com quantidade de MMA adicionado variando de 40 a 90% (PS/PVAc-PMMA X%) estão ilustradas na Figura 5.36. Nessa figura, também são ilustrados os polímeros PS/PVAc-PMMA e PS/PMMA, reproduzidos de BESTETI (2009). Em todas essas micrografias, pode-se perceber que a casca formada não tem o aspecto de um filme, sendo bastante diferente das partículas de PS/PVAc-PMMA (30% de PMMA) apresentada por BESTETI (2009). À medida que se aumenta a quantidade de metacrilato de metila, a T_g do material também aumenta e torna-se superior à do meio reacional. Pode-se notar ainda que a formação de uma casca porosa e que ela se torna similar à encontrada nas partículas de PS/PMMA.



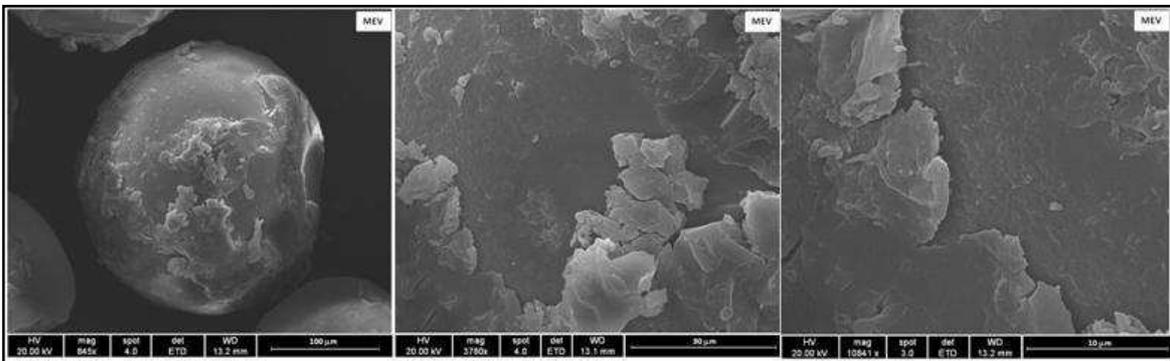
(A)



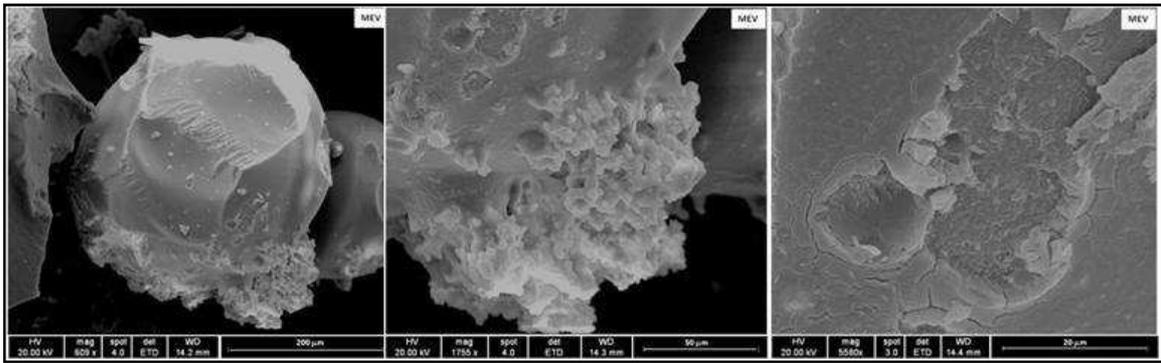
(B)



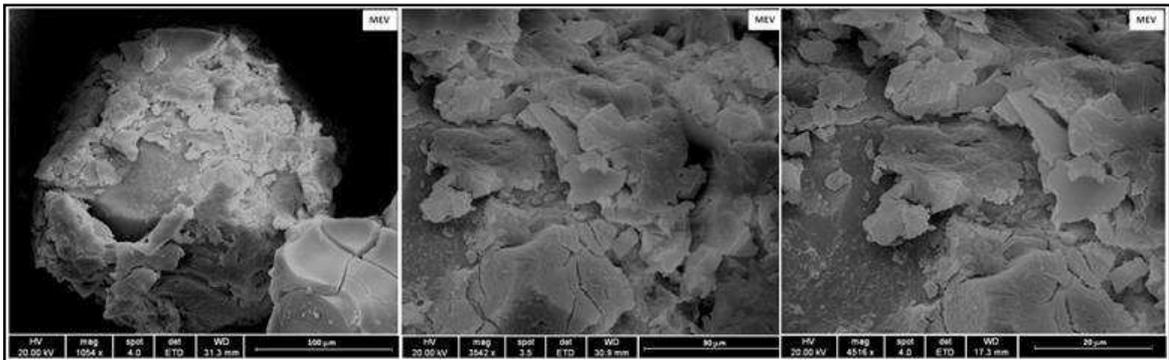
(C)



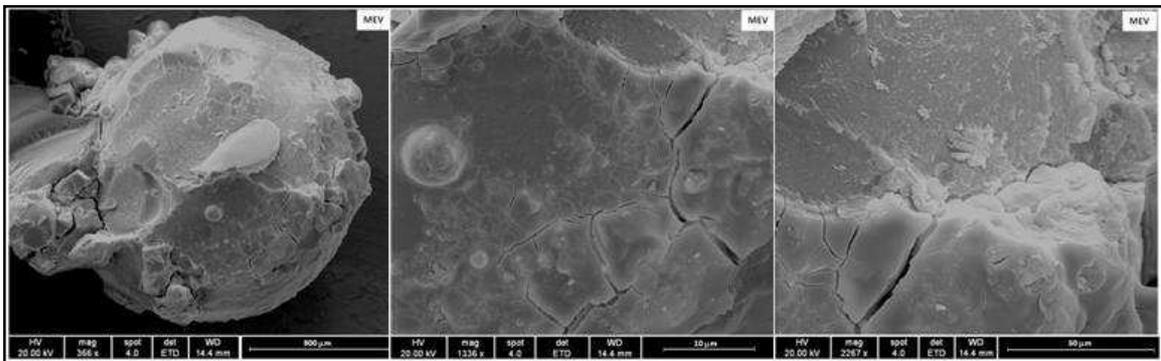
(D)



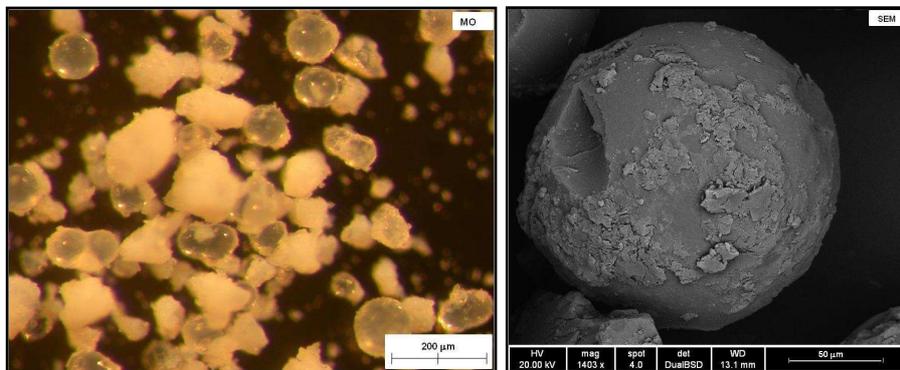
(E)



(F)



(G)



(H)

Figura 5.36: Micrografias de PS/PVac-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% e (H) 100%.

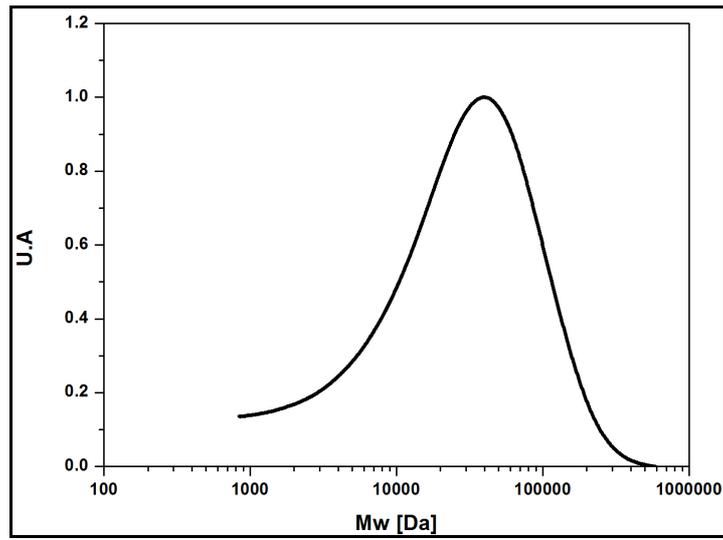
A Tabela 5.7 apresenta os valores do teor de sólidos, massa molar ponderal média e índice de polidispersão das partículas emulsificadas presentes no sobrenadante dessas polymerizações. As distribuições de massas molares são ilustradas na Figura 5.37. A distribuição de massas molares e caracterização do sobrenadante de PS/PVAc-PMMA (30% PMMA) e de PS/PMMA são reproduzidos de BESTETI (2009).

Tabela 5.7: Caracterização do sobrenadante de PS/PVAc-PMMA.

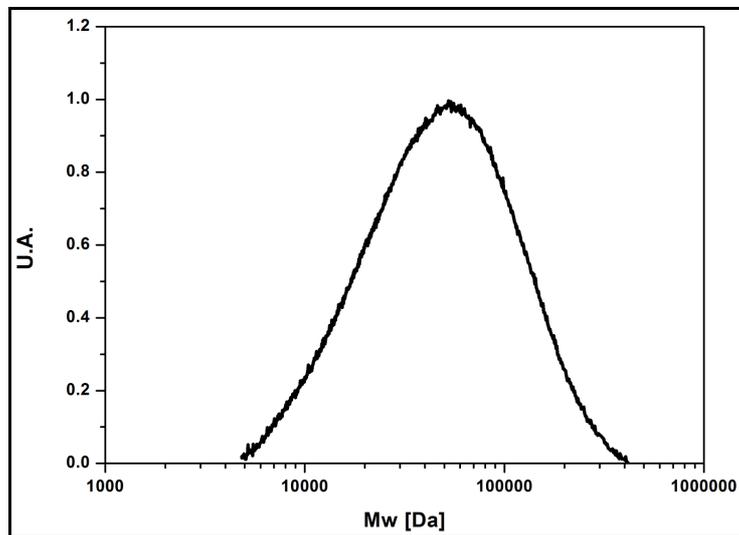
PS/PVAc-PMMA	Teor de Sólidos [%]	Mw [Da]	IP [-]
30% PMMA*	10,1	43×10^3	2,5
40% PMMA	$11,96 \pm 0,13$	34×10^3	1,4
50% PMMA	$13,86 \pm 0,14$	42×10^3	1,9
60% PMMA	$13,75 \pm 0,06$	40×10^3	1,9
70% PMMA	$16,54 \pm 0,20$	108×10^3	3,0
80% PMMA	$16,50 \pm 0,47$	108×10^3	2,5
90% PMMA	$17,59 \pm 0,15$	139×10^3	3,4
100% PMMA*	7,0	208×10^3	4,8

*Retirado de BESTETI (2009).

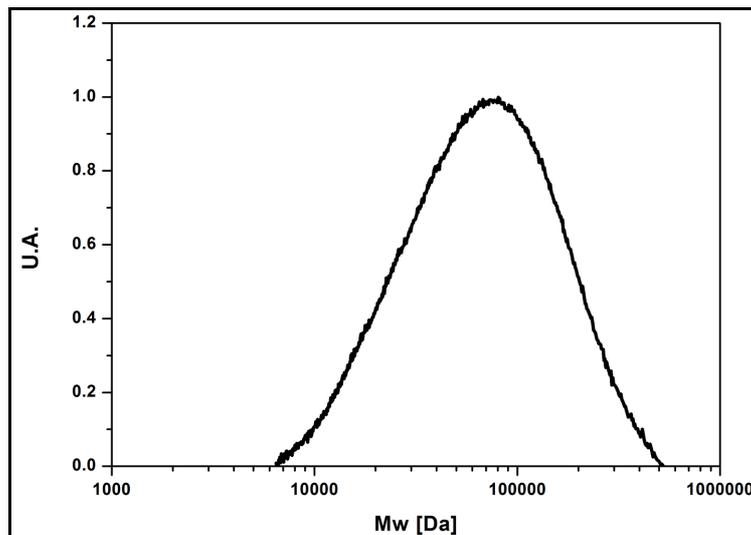
À medida que se aumenta o teor de PMMA nas partículas, ocorre um aumento contínuo do teor de sólidos no sobrenadante, dos valores de Mw e de IP das partículas emulsificadas. O aumento continuado do teor de sólidos com o aumento da concentração do MMA reflete a maior solubilidade do MMA na água e a baixa compatibilidade termodinâmica do PS com o PMMA. Entretanto, o teor de sólidos é menor quando a casca é constituída apenas por PMMA, indicando que a presença de acetato de vinila influencia a estabilidade da emulsão. Nas partículas com teor de PMMA variando de 70 – 90%, os elevados valores de Mw indicam que o sobrenadante é constituído de partículas oriundas de uma polymerização em emulsão. Porém, nos outros casos, o sobrenadante parece ser constituído de resíduos de polímeros ou por partículas que se soltaram da casca.



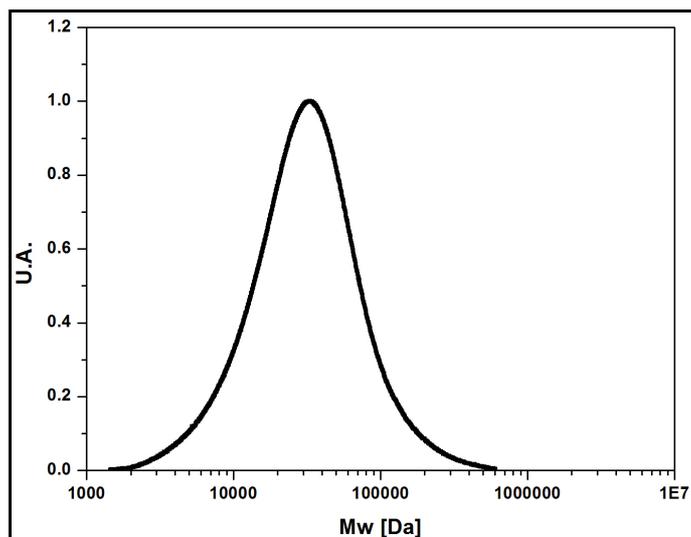
(A)



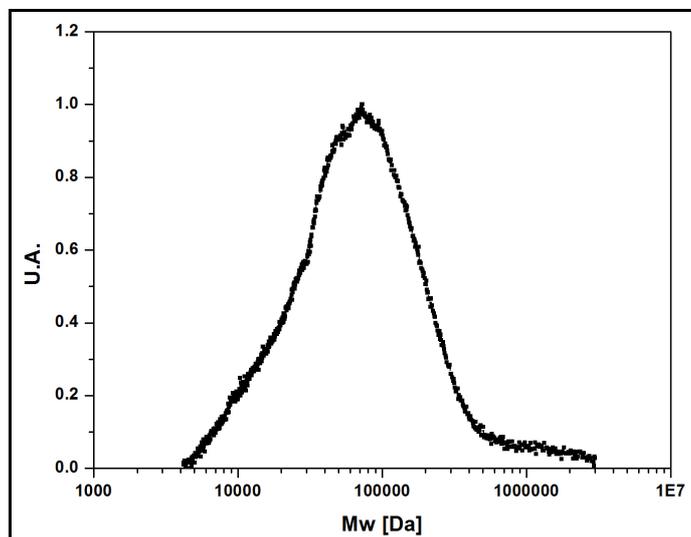
(B)



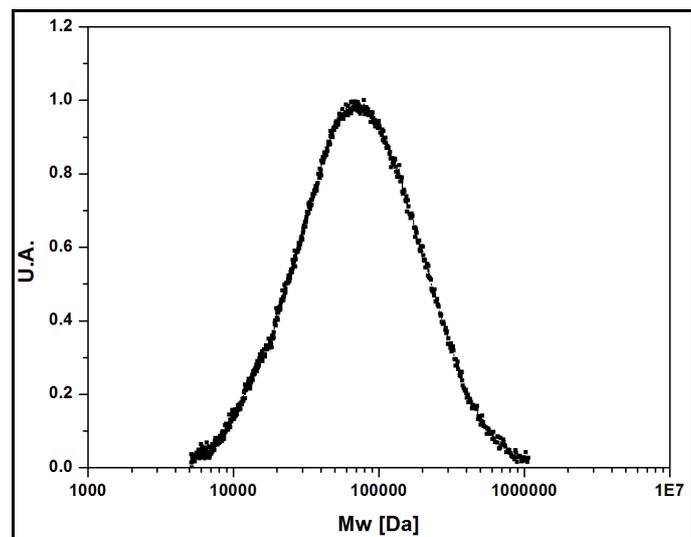
(C)



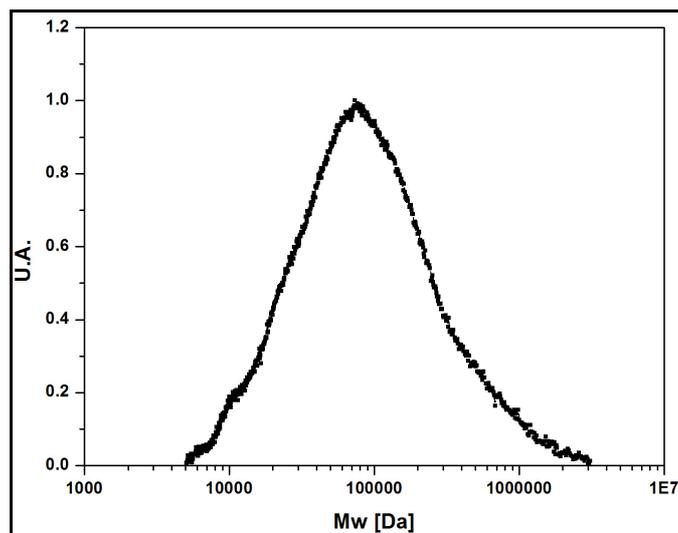
(D)



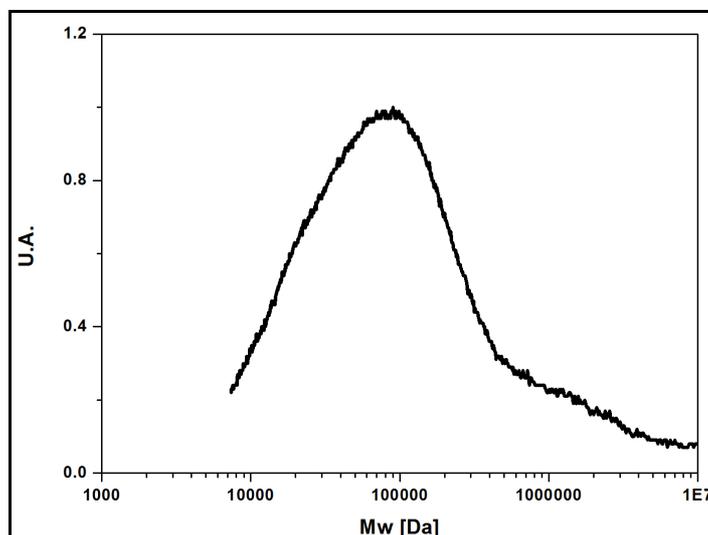
(E)



(F)



(G)



(H)

Figura 5.37: Distribuição de massas molares do sobrenadante de PS/PVAc-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% e (H) 100%.

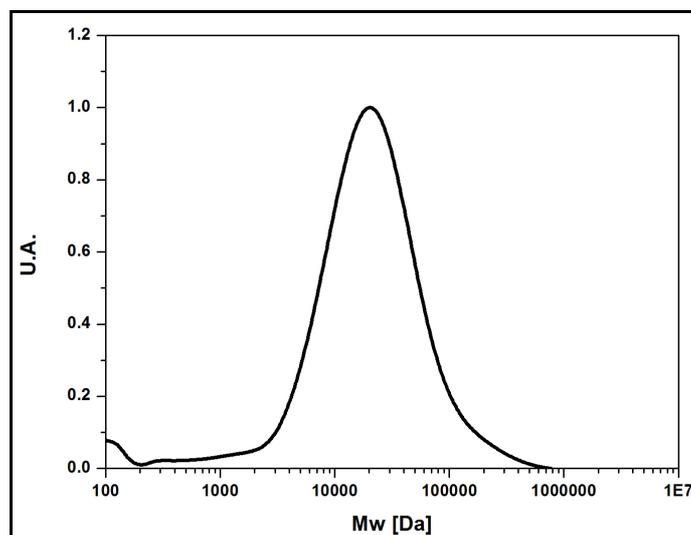
Os valores de M_w e IP são apresentados na Tabela 5.8 e a distribuição de massas molares das partículas casca-núcleo está ilustrada na Figura 5.38. Também são apresentados a caracterização referentes às partículas de PS/PVAc-PMMA (30% PMMA) e PS/PMMA, retiradas de BESTETI (2009). Todas as distribuições de massas molares são unimodais, com valores similares de M_w e IP , porque as taxas de terminação cruzada são altas e controlam a velocidade da reação e o crescimento das cadeias. As partículas casca-núcleo têm comportamento semelhante ao de partículas geradas por um processo de polimerização clássica, refletindo uma intensa interação

entre os componentes do núcleo e da casca, conforme constatado por LENZI (2002), LENZI *et al.*, (2003) e BESTETI (2009). O valor de Mw e IP de PS/PVAc-PMMA 90% está bem próximo daqueles presentes nas partículas de PS/PMMA.

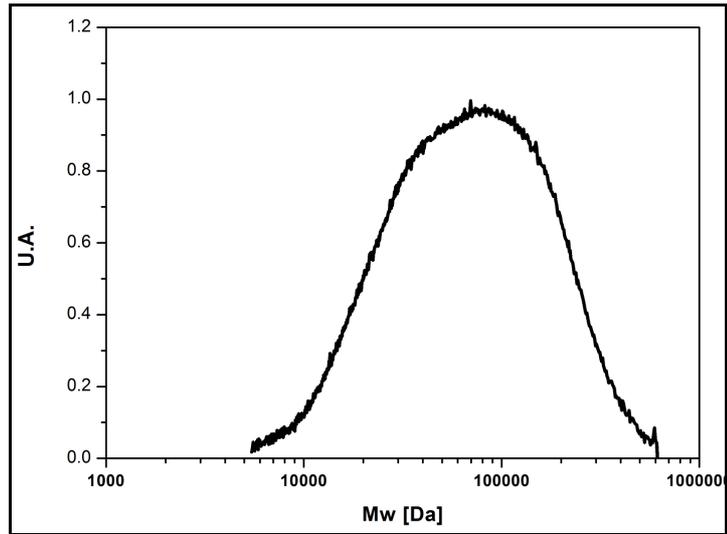
Tabela 5.8: Valores de Mw e IP de PS/PVAc-PMMA.

PS/PVAc-PMMA	Mw [Da]	IP [-]
30% PMMA*	32×10^3	2,0
40% PMMA	49×10^3	1,9
50% PMMA	48×10^3	2,0
60% PMMA	36×10^3	1,7
70% PMMA	40×10^3	1,7
80% PMMA	47×10^3	1,9
90% PMMA	60×10^3	2,2
100% PMMA*	66×10^3	3,2

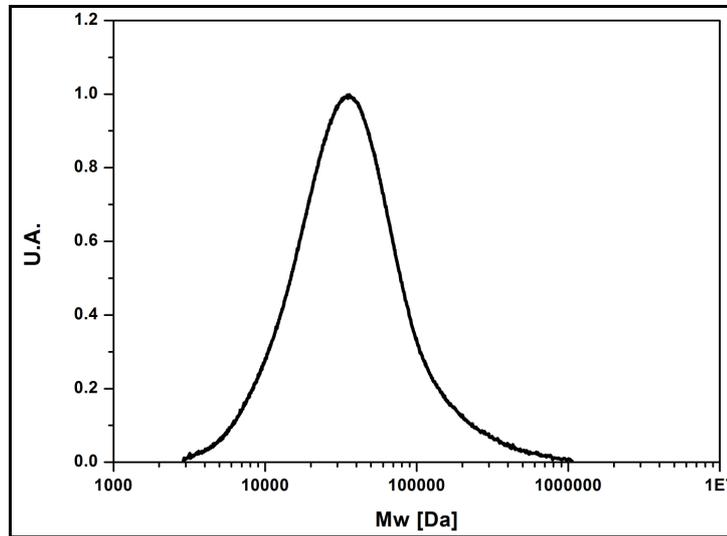
*Retirado de BESTETI (2009).



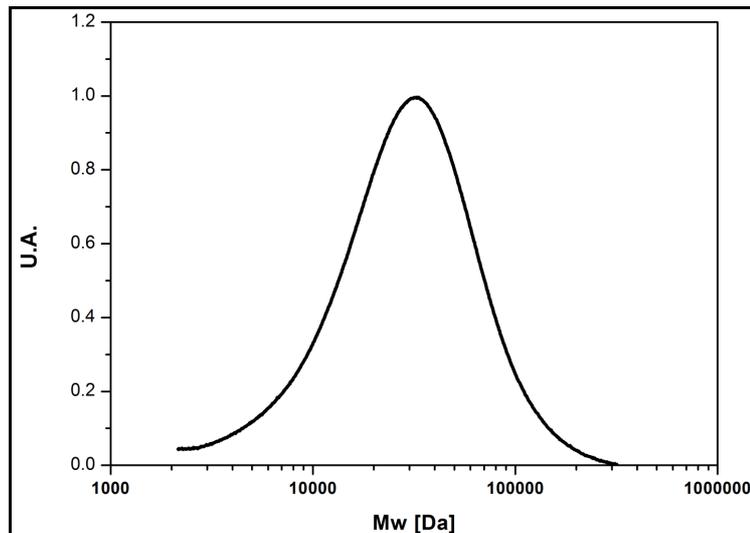
(A)



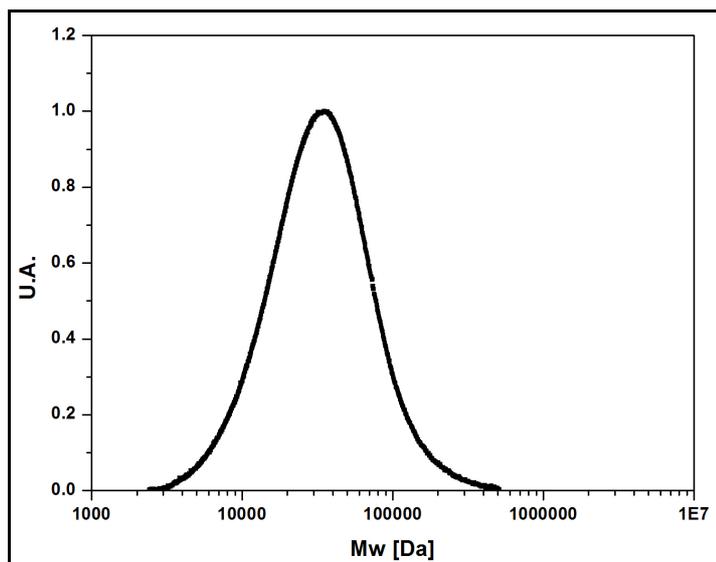
(B)



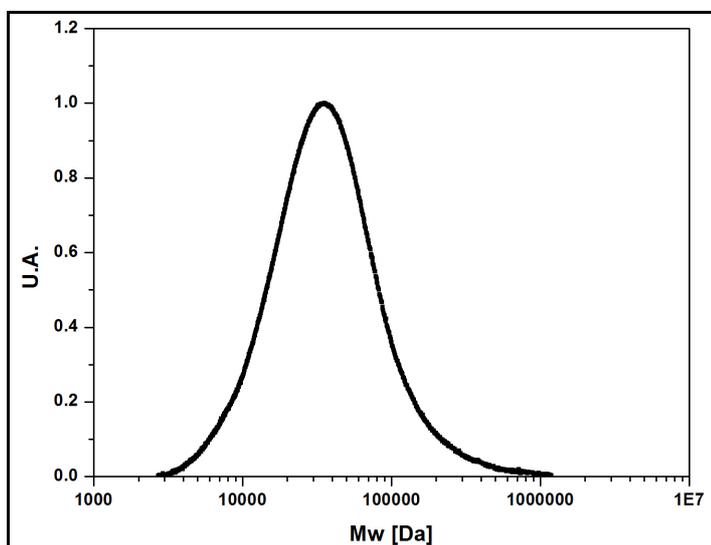
(C)



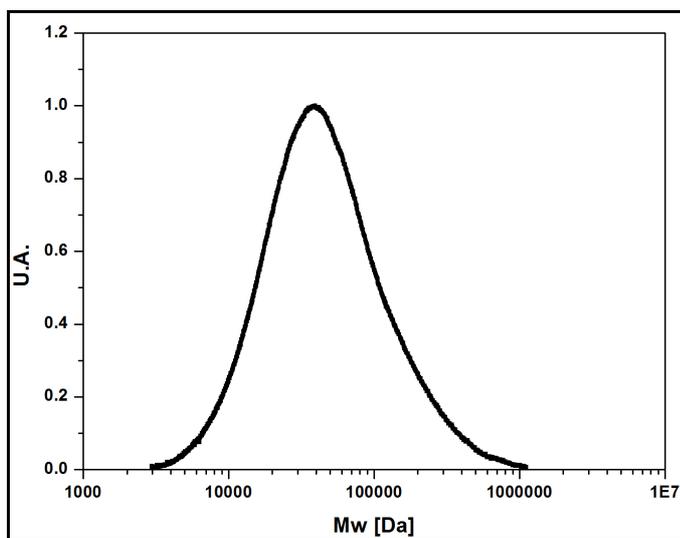
(D)



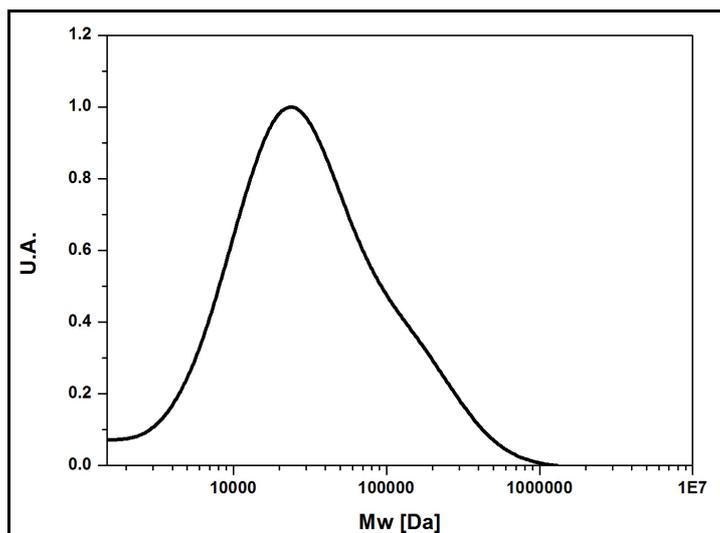
(E)



(F)



(G)



(H)

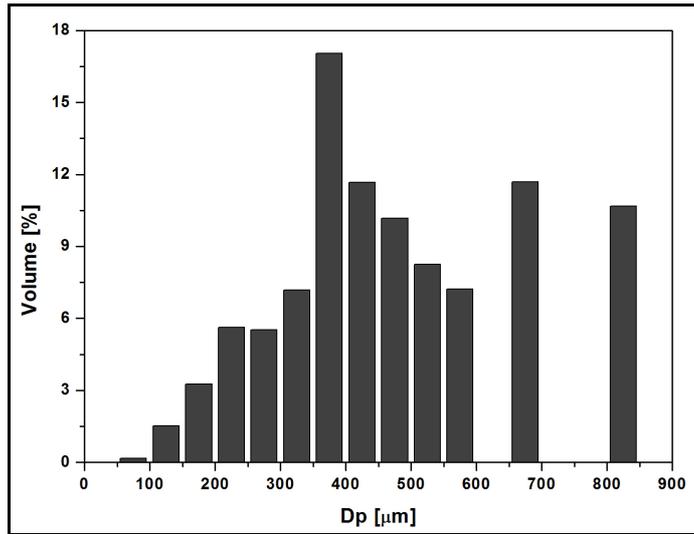
Figura 5.38: Distribuição de massas molares de PS/PVAc-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% e (H).

Os valores dos diâmetros médios são apresentados na Tabela 5.9 e as distribuições de tamanhos de partículas estão ilustradas na Figura 5.39. Essas caracterizações também são apresentadas para os polímeros PS/PVAc-PMMA (30% PMMA) e PS/PMMA, retirados de BESTETI (2009).

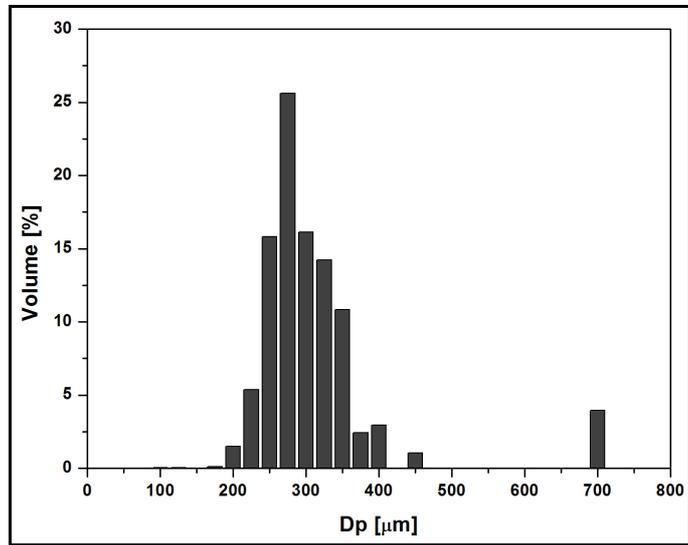
Tabela 5.9: Valores de dos diâmetros médios de PS/PVAc-PMMA.

PS/PVAc-PMMA	Diâmetro Médio [μm]
30% PMMA	230,2
40% PMMA	262,5
50% PMMA	249,8
60% PMMA	222,6
70% PMMA	173,9
80% PMMA	151,6
90% PMMA	324,8
100% PMMA	72,2

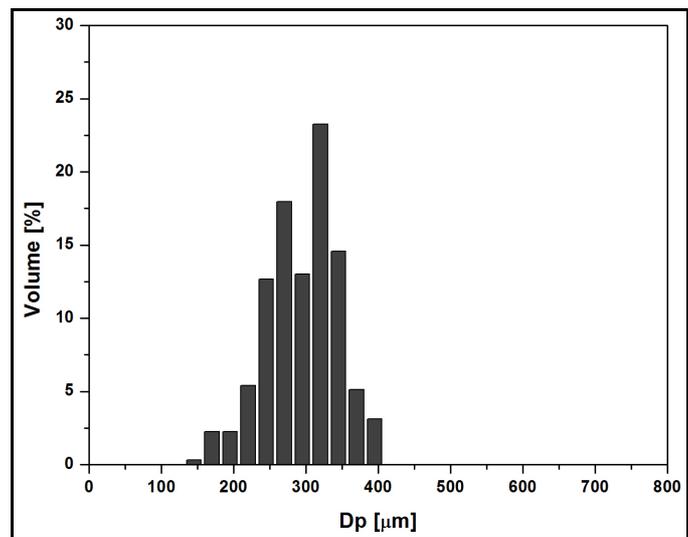
*Retirado de BESTETI (2009).



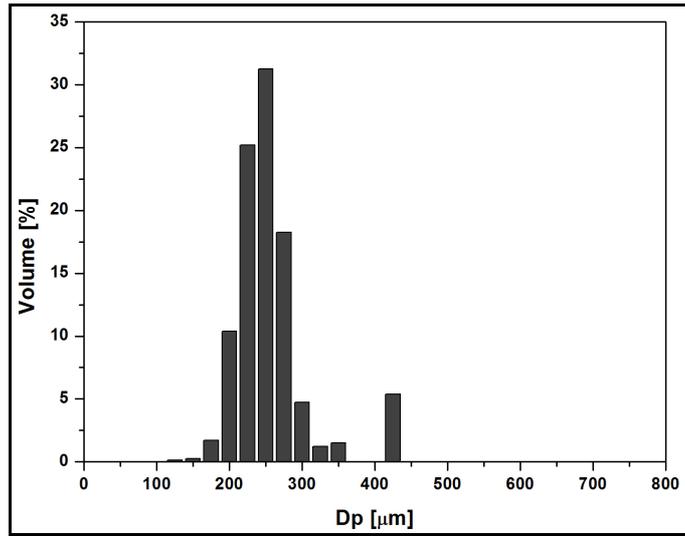
(A)



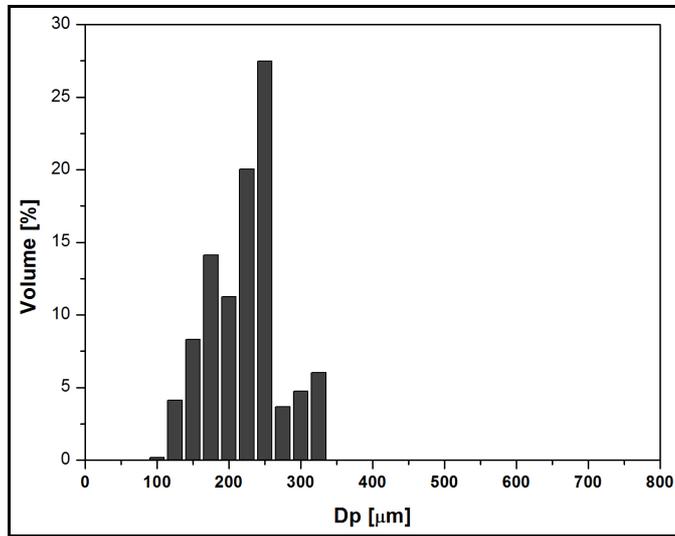
(B)



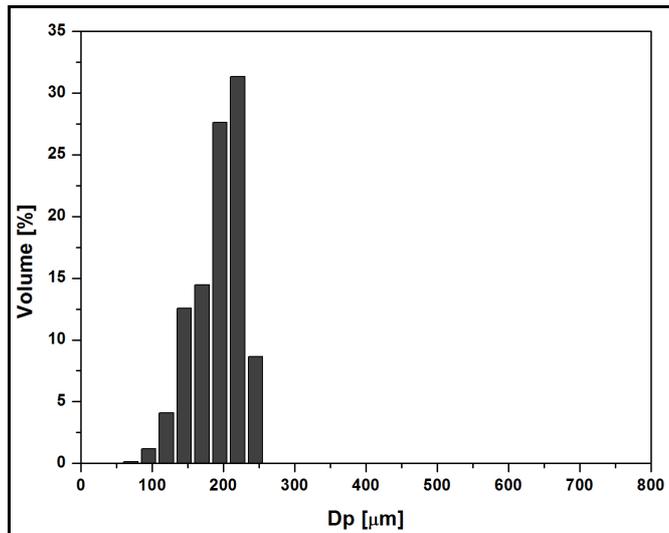
(C)



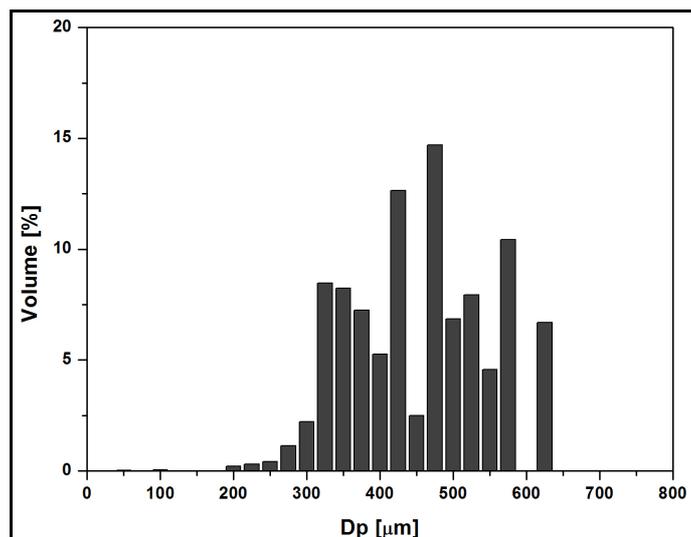
(D)



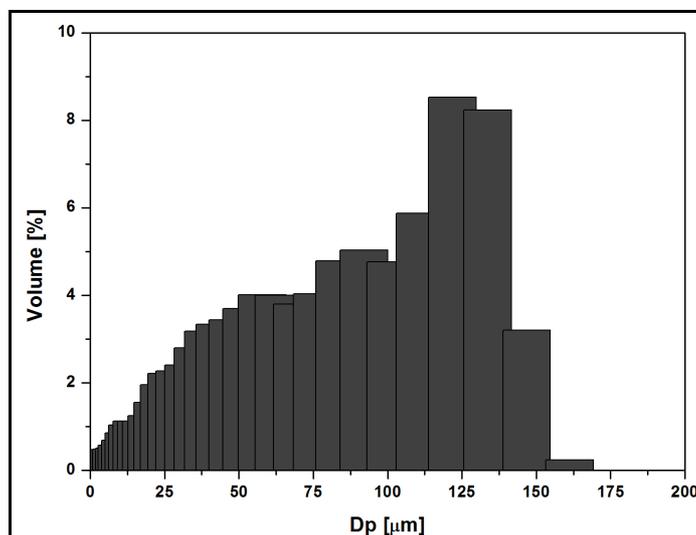
(E)



(F)



(G)



(H)

Figura 5.39: Distribuição de tamanhos de partículas de PS/PVAc-PMMA (A) 30%, (B) 40%, (C) 50%, (D) 60%, (E) 70%, (F) 80%, (G) 90% (H) 100%.

Pode-se observar que as partículas apresentam um diâmetro médio maior que o exibido pelo de núcleo de PS, devido à formação da casca e ao processo de aglomeração dos núcleos. Além disso, o aumento do teor de MMA na casca reduz os tamanhos por causa da natureza adesiva e pegajosa dos polímeros à base de VAc. A exceção ocorre quando se aproxima do teor de 100% de MMA na casca, por causa da aglomeração dos núcleos (BESTETI, 2009). Quando o teor de MMA no polímero foi de 100%, o diâmetro médio das partículas é menor, pois a aglomeração de núcleos é menos freqüente.

Os valores de temperatura de transição vítrea são apresentados na Tabela 5.10 (Apêndice B, Figuras B16-B21). De maneira geral, pode-se dizer que os valores de Tg apresentados pelas partículas casca-núcleo são menores que os exibidos pelo polímero de PS/PMMA 2 (A Tg do PS é de 96 °C e a do PMMA, é de 104 °C, segundo BESTETI (2009)). Esse comportamento é um indicativo de que há a incorporação de acetato de vinila ao longo da polimerização.

Tabela 5.10: Valores de Tg.

PS/PVAc-PMMA	Tg [°C]
40% PMMA	87.9
50% PMMA	94.1
60% PMMA	92.8
70% PMMA	92.6
80% PMMA	94.7
90% PMMA	94,4

A variação da quantidade de metacrilato de metila adicionado durante a polimerização de polímeros com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila) provoca grandes modificações nas propriedades desses materiais. Pode-se notar pelas micrografias apresentadas na Figura 5.36 que a morfologia altera consideravelmente, principalmente em relação àquela exibida por partículas de PS/PVAc-PMMA (30% PMMA), que foram sintetizadas por BESTETI (2009), que não tinha casca porosa e se depositava sobre o núcleo na forma de um filme, fato não observado nesses materiais apresentados. Isso confirma o mecanismo proposto por BESTETI (2009), de que a Tg do material constituinte da casca é determinante para a formação ou não da casca porosa.

5.5. Testes Iniciais – Receita de Polimerização

Todos os polímeros obtidos e analisados até o presente ponto desse trabalho se basearam na receita proposta por LENZI (2002). Por isso, foram propostas algumas modificações na receita inicial, em relação à vazão de alimentação do monômero da emulsão, concentração de emulsificante e concentração de iniciador, para

polimerizações em suspensão e emulsão de poli(estireno), com duração de 2h da etapa de suspensão. A Tabela 5.11 apresenta as condições avaliadas para cada uma dessas variáveis.

Tabela 5.11: Receitas de polimerização.

Reação	Iniciador [g]	Vazão de Alimentação [l/h]	Emulsificante [g]
R1	0,3	0,60	4,0
R2	0,3	0,30	4,0
R3	0,3	0,20	4,0
R4	0,3	0,20	1,0

A primeira e a segunda reações apresentavam a mesma quantidade de iniciador utilizada até o momento. A concentração de emulsificante era bem maior (nas reações anteriores usava-se 2,5 g); portanto, o número de micelas formadas deve ser maior e, conseqüentemente, o número de partículas de polímero produzidas pela polimerização em emulsão deve aumentar, com a conseqüente redução do tamanho das partículas produzidas em emulsão. Na reação R1, a alimentação de monômero foi aumentada e durou cerca de 30 minutos. Logo após o seu término, pode-se constatar que a reação estava descontrolada, sendo que o produto final era formado por duas esferas grandes de poli(estireno). Como a alimentação de monômero foi muito rápida, acredita-se que as partículas de polímero que estavam sendo formadas pela emulsão, ficavam muito inchadas com monômero e adquiriam uma elevada viscosidade, o que aumentava a tendência de aglomeração. Além disso, a quantidade de emulsificante presente no meio, não foi suficiente para estabilizar as gotas de monômero e também as partículas de polímero. Mesmo quando a vazão de alimentação foi diminuída para 0,30 l/h, o mesmo comportamento foi observado. Portanto, esses experimentos mostram que existem limitações sobre as vazões que podem ser praticadas em fase de produção da emulsão. Além disso, os ensaios mostram que o estado da gotas formadas e adicionadas ao meio afeta o transcorrer da reação, sendo possível imaginar que a reação deve prosseguir em modo de avidez. Dessa forma, propôs-se um teste, utilizando uma vazão de 0,20 l/h. Partículas de poli(estireno) foram produzidas, porém apresentavam-se bastante aglomeradas, conforme ilustra a Figura 5.40. As partículas apresentaram um formato bastante irregular e, aparentemente, esses grânulos eram compostos por vários núcleos

aglomerados. Nenhuma porosidade pode ser notada. Dessa forma, apesar da reação ter transcorrido sem formar coágulos, a vazão muito elevada impediu que as nanopartículas fossem formadas corretamente e se agrupassem de forma organizada ao redor do núcleo. Esses resultados corroboram os comentários apresentados anteriormente.

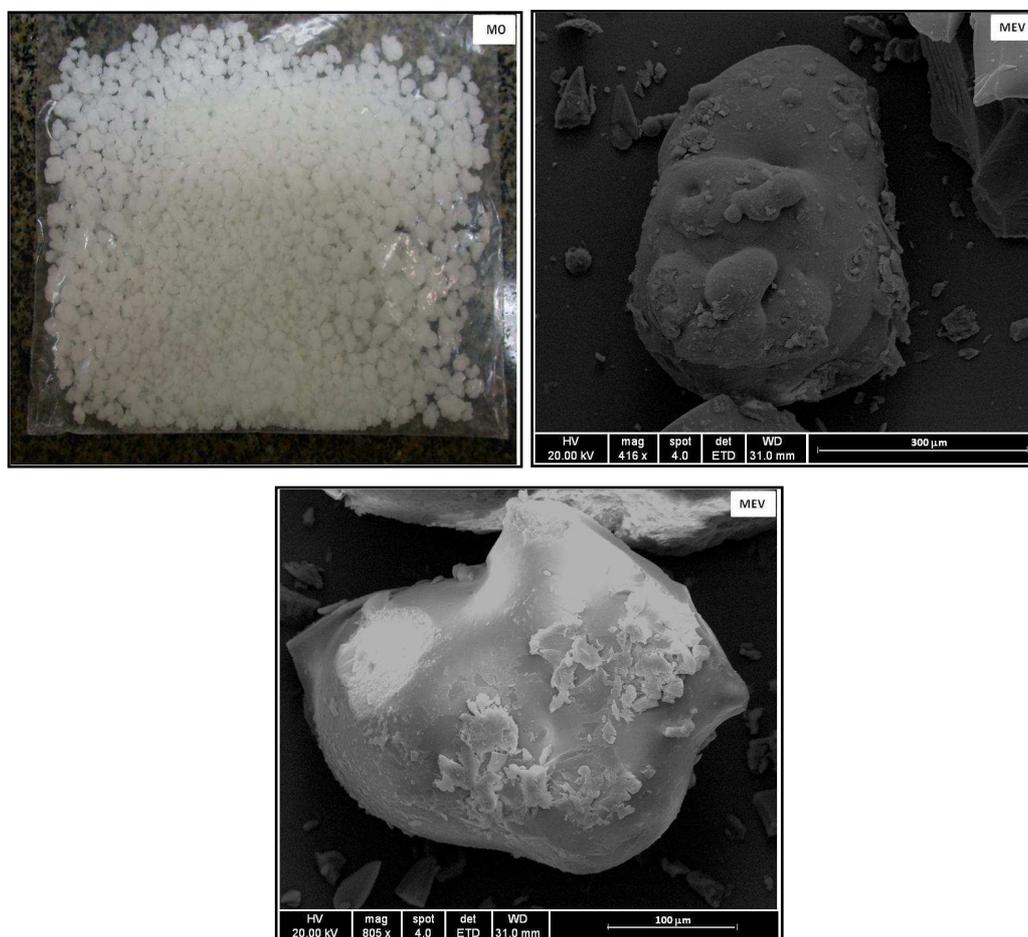


Figura 5.40: Micrografias de R3.

O teor de sólidos do sobrenadante foi nesse caso igual a $18,38 \pm 0,01\%$, indicando que uma quantidade considerável de partículas geradas pela polimerização em emulsão não foi capturada pelo núcleo, ao contrário do que foi observado na receita original. O diâmetro médio das partículas emulsificadas foi igual a $256,0 \pm 0,7$ nm. A distribuição de massas molares do sobrenadante está ilustrada na Figura 5.41. Essas massas molares provavelmente indicam a existência de interação significativa entre as partículas suspensas e emulsificadas. Os valores de massa molar ponderal média e do índice de polidispersão são, respectivamente, iguais a 56×10^3 Da e 2,2. A distribuição de massas molares era unimodal e os valores de Mw e IP não foram elevados, sendo

similares aos exibidos por materiais produzidos por polimerizações em suspensão. Isso reforça a hipótese de que o material emulsificado pode ter aglomerado e se desprendido das partículas em suspensão.

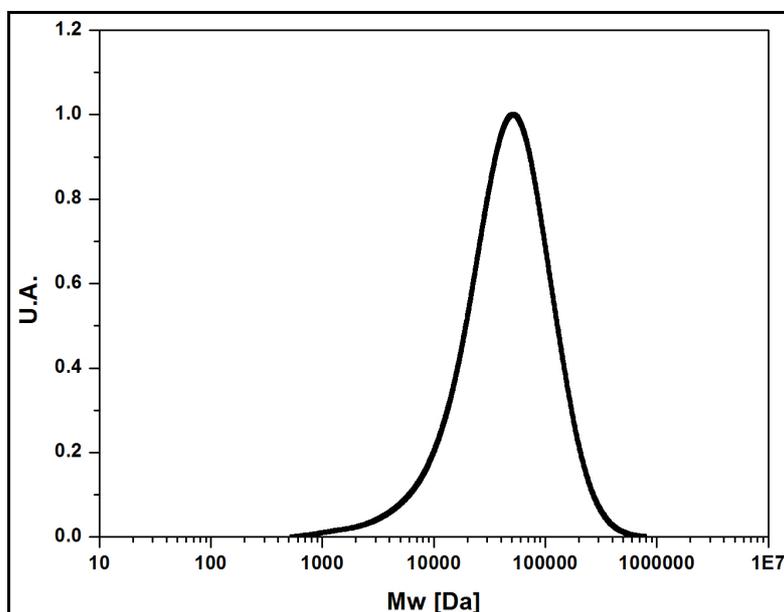


Figura 5.41: Distribuição de massas molares do sobrenadante de R3.

A distribuição de massas molares das partículas de polímero está ilustrada na Figura 5.42. A massa molar ponderal média foi igual a 35×10^3 Da e o IP foi igual a 2,7. Esses valores são similares aos exibidos por partículas oriundas de uma polimerização em suspensão clássica e ao material emulsificado, reforçando a hipótese anterior. A interação entre os componentes que formam o núcleo e a casca é bastante intensa, pois a partícula final, apesar de ser composta por materiais distintos, não exhibe um caráter compartimentalizado. Esse comportamento também foi observado por LENZI (2002), LENZI *et al.* (2003) e BESTETI (2009) em algumas partículas casca-núcleo. A temperatura de transição vítrea desse material foi de $95,5$ °C (Apêndice B, Figura B22). Esse valor é próximo ao encontrado pelas partículas casca-núcleo de PS, que foi de 98 °C (BESTETI, 2009).

Na última reação, a concentração de emulsificante foi menor, mantendo a mesma vazão de alimentação de R3. O polímero obtido formou um aglomerado, ao final da alimentação de monômero e não se obteve nenhum sobrenadante. Nesse caso, a baixa concentração de emulsificante, abaixo da Concentração Micelar Crítica (CMC),

cujo valor é de 0,0083 mol/l para o lauril sulfato de sódio (JAN *et al.*, 2004), fez com que a nucleação fosse coagulativa e as partículas, por não estarem satisfatoriamente estabilizadas, uma vez que a quantidade de surfactante não era suficiente para estabilizar as gotas de monômero, se aglomerassem.

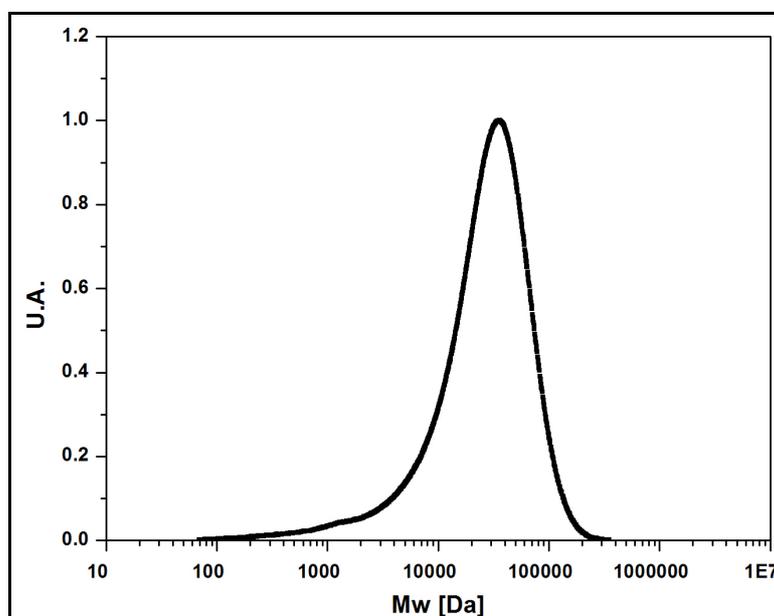


Figura 5.42: Distribuição de massas molares de R3.

Apesar de esses testes terem sido preliminares e não avaliados em toda a sua extensão, pode-se perceber que, para a formação de partículas com morfologia casca-núcleo pela polimerização simultânea em suspensão e emulsão, existem limites máximos para a vazão de alimentação que garantem o transcurso normal da reação. Valores acima desse limite, geram um descontrole na reação, não ocorrendo a formação de partículas de polímero e levando as partículas a se aglomerarem. Já em relação à concentração de emulsificante, parece claro que as partículas produzidas em emulsão sejam estabilizadas, para que a reação transcorra em condições de normalidade. Baseado nesses resultados, parece pertinente recomendar que a reação em emulsão seja conduzida em condição de avidez (taxa de reação maior que a taxa de alimentação) e na presença de emulsificante suficiente para estabilização das partículas formadas.

CAPÍTULO 6

Resultados e Discussão II: Imobilizações de Enzimas

Este capítulo tem como objetivo mostrar o comportamento da atividade enzimática e dos parâmetros de imobilização quando se utilizam os polímeros casca-núcleo desenvolvidos como suporte para a imobilização de enzimas. A influência das características das partículas poliméricas desenvolvidas, principalmente em relação à área específica, é avaliada de forma a selecionar o suporte mais adequado para algumas aplicações. Ao final, é apresentada uma análise econômica simplificada do processo, a fim de comparar o processo proposto para fabricação dos suportes poliméricos com materiais disponíveis comercialmente.

6.1. Introdução

A grande vantagem de produzir suportes poliméricos por meio da polimerização simultânea em suspensão e emulsão é que essa técnica, em uma única etapa e sem a presença de quaisquer outros aditivos porogênicos, origina produtos com boas características morfológicas. Além disso, a composição da casca pode ser facilmente alterada para se adaptar às propriedades das enzimas a serem imobilizadas, não sendo necessária qualquer funcionalização posterior, diferentemente dos suportes disponíveis atualmente. Esse fato torna o processo de obtenção simplificado e com baixo custo, condições necessárias e adequadas para a obtenção de bons suportes.

Como será demonstrado a seguir, os testes iniciais de imobilização foram feitos com os materiais desenvolvidos por BESTETI (2009). A partir dos resultados obtidos algumas modificações foram sendo sugeridas, levando ao desenvolvimento de grande parte dos polímeros descritos na seção anterior. A Tabela 6.1 resume as características de todos esses materiais, que são importantes para a imobilização. Para efeito de

comparação, os testes enzimáticos também foram feitos com um suporte comercial, o Accurell[®] MP1000.

Tabela 6.1: Características dos suportes casca-núcleo.

Suportes	Dp [Å]	Área Específica [m ² /g]	Ângulo de Contato [°]
Accurell [®] MP1000	39,0	230,0	87,70 ± 2,13
PS/PS 4*	218,8	7,9	90,89 ± 4,26
PS/PMMA 2*	141,2	36,7	83,40 ± 4,31
PS/PMMA 2S*	133,3	30,5	84,44 ± 1,41
PS/PMMA 4*	195,0	0,9	74,62 ± 0,22
PS/PVAc*	0,0	0,0	-
PS/PVAc-co-PMMA 3*	0,0	0,0	-
PS/PVAc-co-PMMA 3S*	0,0	0,0	-
PS/PS-co-PC*	251,2	6,2	86,24 ± 2,17
PMMA/PS 2*	272,3	8,7	90,06 ± 1,54
PMMA/PS 4*	354,0	3,4	92,25 ± 0,82
PMMA/PMMA 30 min	175,4	6,1	70,81 ± 2,61
PMMA/PMMA 1h	211,6	5,0	74,50 ± 3,66
PMMA/PMMA 2h	213,6	3,7	75,67 ± 0,83
PMMA/PMMA-BV	161,2	2,0	89,76 ± 1,28
PMMA/PMMA-BV SAP	181,9	3,4	78,37 ± 11,13
PS-DVB/PS	185,9	10,9	87,09 ± 1,15
PS-DVB/PS-DVB	190,4	28,9	87,75 ± 0,81
PS/PS-DVB	185,5	9,5	85,96 ± 0,64
PMMA-DVB/PMMA	191,4	8,7	-
PMMA-DVB/PMMA-DVB	193,4	12,6	-
PMMA/PMMA-DVB	144,3	11,3	68,44 ± 0,49

* Retirado de BESTETI (2009).

^ Não foi possível formar pastilha desse material para determinar o ângulo de contato.

De maneira geral, pode-se observar que a adição de divinilbenzeno modificou consideravelmente uma propriedade muito importante para a imobilização de enzimas:

o valor da área específica. Apesar disso, a adição de DVB também ocasionou uma redução no diâmetro médio de poro. Os materiais contendo poli(estireno) apresentam os maiores valores de ângulo de contato e são mais hidrofóbicos. Já aqueles materiais com poli(metacrilato de metila) são mais hidrofílicos. É importante observar que a medida de ângulo de contato está associada primariamente com as características da casca, onde deve ocorrer a suportação da enzima. Por isso, o ângulo de contato constitui um bom parâmetro de análise do processo de imobiliza o. O Accurell[®] MP1000 (no restante do texto, esse material será chamado apenas de Accurel) tem uma hidrofobicidade semelhante   do poli(estireno) e apresenta o maior valor de área específica, dentre os suportes analisados. Conforme detalhado por diversos autores, na imobiliza o por adsor o física a área específica, o diâmetro de poro e a composi o química do suporte são os fatores determinantes para o sucesso do procedimento, uma vez que se relacionam com o micro-ambiente criado ao redor da enzima e com sua conforma o, bem como com os efeitos de difusão de substrato e de produtos (VILLENEUVE *et al.*, 2000, SALIS *et al.*, 2003, LI *et al.*, 2004; BLANCO *et al.*, 2007).

Todas as imobiliza es e rea es enzimáticas utilizaram a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B).

6.2. Rea es de Hidrólise

A atividade de hidrólise foi realizada com os suportes desenvolvidos, que apresentam diferenças de morfologia, grau de hidrofobicidade e de estruturas químicas presentes nas cadeias poliméricas. Dessa forma, a adsor o física da enzima pode envolver diferentes regiões de sua estrutura, promovendo diferenças de intera o, disposi o e rigidez da proteína e micro-ambiente formado ao seu redor, fatores que acabam por influenciar a sua atividade catalítica (FERNÁNDEZ-LORENTE *et al.*, 2001; GUISÁN *et al.*, 2001; ABIAN *et al.*, 2002; PALOMO *et al.*, 2002b).

De acordo com MOJOVIC *et al.* (1998), as lipases podem ser consideradas esferas com diâmetro na faixa de 5 a 7 nm (50 a 70  ). Os materiais porosos devem ter diâmetros, portanto, pelo menos um pouco superior a esse valor. Em poros muito pequenos, a enzima adsorvida pode sofrer deforma es e podem ocorrer efeitos de

difusão de produtos e substrato nos pequenos poros. Por outro lado, em poros extremamente largos, a enzima pode sofrer deformações em sua estrutura e a dessorção fica mais facilitada. De acordo com a Tabela 6.1, os diâmetros dos poros variam na faixa entre 130 a 350 Å, compatível com o tamanho característico da lipase.

É importante ressaltar que a quantidade de enzima empregada é superior que à usualmente empregada quando se quer avaliar apenas os parâmetros de imobilização. Nesse trabalho, objetivava-se, além disso, obter elevados valores de atividade de enzima imobilizada (U_{imo}). As reações de hidrólise também foram realizadas apenas com o suporte (sem a presença de enzima) e não ocorria reação, indicando que o suporte não tem atividade e que os resultados apresentados são, de fato, correspondentes apenas à atividade enzimática. Os primeiros ensaios enzimáticos foram conduzidos com uma atividade de entrada em torno de 40 UI/grama de suporte (nesse trabalho, em todas as imobilizações, foi empregado 1g de suporte), que, provavelmente não leva à saturação do suporte. Os valores dos parâmetros de imobilização e atividade do biocatalisador (enzima imobilizada) são apresentados na Tabela 6.2.

Para todas as imobilizações, pode-se notar que, apesar de muitos suportes terem exibido eficiência de imobilização de 100%, a retenção de atividade exibe valores abaixo de 35%, o que significa que nem toda lipase imobilizada está ativa no suporte. Esse comportamento pode estar associado a mudanças na estrutura enzimática, que alteram a atividade catalítica.

Para os suportes com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(metacrilato de metila) (PS/PMMA), o aumento do valor da área específica conduz a maiores retenções de atividade, uma vez que a enzima consegue se imobilizar de uma forma que não haja grandes modificações na sua estrutura (FREIRE, 1988; SALIS *et al.*, 2003; SALIS *et al.* 2008). Nesse sentido, o maior valor de retenção de atividade, de 11,1%, foi exibido por PS/PMMA 2, com eficiência de imobilização de 100% e rendimento de imobilização de 11,1%. Quando se utiliza esse suporte saponificado (PS/PMMA 2S), a eficiência de imobilização continua a mesma (a área específica não sofre uma modificação considerável), porém a retenção de atividade foi menor (e também o rendimento da imobilização), podendo isso estar relacionado com a modificação da composição do

polímero, que modifica a interação com a enzima. Em relação ao suporte PS/PMMA 4, a eficiência de imobilização foi bastante baixa (22,6%), uma vez que a área específica era baixa; porém, a pequena quantidade de enzima imobilizada conseguiu conservar a sua atividade, levando a um maior valor de retenção de atividade (34,3%). Isso pode estar relacionado com a composição, mais hidrofílica do material, e não provoca mudanças bruscas na conformação enzimática após a imobilização. Blendas de PS e PMMA também foram analisadas por LI *et al.* (2006) na imobilização de albumina, indicando que essa proteína tem uma maior preferência pelos domínios de PS. No caso das partículas casca-núcleo, a composição de material, uma espécie e mistura entre materiais polares e apolares, parece fazer com a enzima não sofra uma distorção na sua estrutura.

Tabela 6.2: Parâmetros de imobilização (Atividade enzimática de entrada/ $U_c = 40UI$).

Suporte	U_c	U_s	$U_{t\acute{e}orico}$	U_{imo} [UI/gsuporte]	E_{imo} [%]	R_a [%]	η [%]
Accurel [®] MP1000	47,4	0	47,4	2,4	100,0	5,1	5,1
PS/PS 4	31,3	0	31,3	2,0	100,0	6,5	6,5
PS/PVAc	22,6	17,5	5,0	0,1	22,2	1,6	0,4
PS/PVAc-co-PMMA 3	43,8	39,0	4,8	0,2	11,4	4,0	0,5
PS/PVAc-co-PMMA 3S	43,8	39,0	4,8	0,2	11,4	4,0	0,5
PS/PMMA 2	41,3	0	41,3	4,6	100	11,1	11,1
PS/PMMA 4	31,3	24,6	6,7	2,4	22,6	34,3	7,7
PS/PMMA 2S	41,3	0	41,3	3,2	100	7,7	7,7
PS/PS-co-PC	47,0	0	47,0	6,8	100	14,5	14,5
PMMA/PS 2	41,3	0,5	40,8	1,4	98,8	3,4	3,4
PMMA/PS 4	41,3	0	41,3	2,4	100	5,8	5,8
PMMA/PMMA 2h	47,0	8	39,0	6,2	82,9	15,9	13,3

Para os suportes PS casca-núcleo e PS/PS-co-PC (ambos apresentaram eficiência de imobilização de 100%), a presença de cardanol conduziu a uma maior retenção de atividade (14,5%) e também a um maior rendimento de imobilização (14,5%). Como o suporte PS/PS-co-PC tem área específica menor que o suporte de PS casca-núcleo e os seus respectivos diâmetros de poro são semelhantes, a maior retenção de atividade está diretamente relacionada com a composição. A molécula de cardanol tem cadeias laterais longas, de forma que a interação entre enzima e o suporte pode causar menores distorções em sua estrutura terciária. Segundo PALOMO *et al.* (2002a), grupos octadecil, por terem uma cadeia lateral com 18 carbonos, causa a hiperativação da enzimas, que reconhece o suporte como uma molécula de substrato, aumentando a afinidade pelo suporte. Aparentemente, a presença de cardanol também aumenta a afinidade entre enzima e substrato. A imobilização de lisozima por FIGUEIREDO *et al.* (2005) indicou que as partículas casca-núcleo de poli(estireno) constituem bons suportes, pois exibiram uma atividade comparável à da hidroxiapatita e de Amberlit IRA 120 (suporte comercial).

Nos suportes PMMA/PS 2 e PMMA/PS 4, a maior retenção de atividade e rendimento de imobilização foram encontrados no último, que tem a menor área específica, porém é mais hidrofóbico.

O suporte PMMA/PMMA 2h exibiu bons valores de retenção de atividade e rendimento de imobilização (com eficiência de imobilização de 82,9). Isso é consequência da interação existente entre a enzima e o suporte, de forma que a disposição da proteína na superfície do suporte causa menores distorções em sua estrutura. Como já relatado, isso pode influenciar a entrada de substrato no sítio ativo e melhorar a atividade catalítica. Segundo CHEN *et al.* (2007b), a interação de lipase de *Candida antarctica* é mais intensa em suportes à base de poli(estireno) do que em relação aos de poli(metacrilato de metila), o que pode causar modificações em sua estrutura, levando à queda na atividade.

De maneira geral, os suportes casca-núcleo exibiram uma retenção de atividade maior que a do Accurel, que apresenta a maior área específica. Dessa forma, os suportes

poliméricos desenvolvidos parecem apresentar características químicas muito favoráveis para a imobilização de CAL-B.

Os suportes PS/PVAc, PS/PVAc-PMMA 3 e PS/PVAc-PMMA 3S exibiram os menores valores de eficiência de imobilização e retenção de atividade. A área específica e o diâmetro de poro foram praticamente iguais a zero, o que impediu que a enzima fosse adsorvida na superfície do suporte. Os melhores resultados foram encontrados com os materiais que tinham casca mais hidrofílica.

Os testes enzimáticos iniciais permitiram eliminar alguns suportes do conjunto de candidatos, como PS/PVAc, PS/PVAc-PMMA 3, PS/PVAc-PMMA 3S, PS/PMMA 2S e PS/PMMA 4. Os primeiros foram condenados por formarem filmes na casca pela presença de PVAc, enquanto os outros provavelmente refletem a baixa compatibilidade existente entre o PS e o PMMA. Aparentemente, a composição dos suportes, tendo como base o poli(estireno) e o poli(metacrilato de metila) exibiram excelentes resultados. A utilização de acetato de vinila levou à formação de suportes sem casca porosa, impedindo a imobilização da enzima, e, portanto, propôs-se a sua substituição por outro éster de vinila, o benzoato de vinila, de forma que pudesse ser feita a análise do material saponificado. Foi observado também que, durante o procedimento de imobilização, os suportes não apresentavam uma resistência mecânica satisfatória. Ao final do pré-tratamento com álcool (como descrito no Capítulo 4), os polímeros ficavam “inchados”, o que dificultava o seu manuseio nas outras etapas. Além disso, as partículas casca-núcleo apresentavam áreas específicas muito menores que os produtos comerciais. Dessa forma, foi proposto o emprego do divinilbenzeno como comonômero, cuja função é promover a reticulação das cadeias poliméricas, influenciando na sua resistência química e mecânica. A influência de divinilbenzeno sobre a porosidade de alguns materiais também está relatada na literatura (KOTHA *et al.*, 1996; CHEN *et al.* 2007a; CHEN *et al.*, 2008).

Ensaio enzimáticos foram conduzidos com esses materiais, usando uma atividade de entrada maior, em torno de 400 UI, e estão apresentados na Tabela 6.3. A eficiência de imobilização diminui quando ocorre o aumento da carga inicial de enzima. Em alguns casos, a retenção de atividade também apresentou uma redução. Quando há o

aumento da quantidade inicial de enzima utilizada na imobilização, pode ocorrer o bloqueio do sítio ativo da enzima devido à formação de mais de uma camada de enzima, bloqueando o sítio ativo e dificultando a difusão de produtos e substratos, denominado de fenômeno de “overcrowding” (FREIRE, 1988; SALIS *et al.*, 2003; SALIS *et al.* 2008).

Tabela 6.3: Parâmetros de imobilização (Atividade enzimática de entrada/ $U_c = 400\text{UI}$).

Suporte	U_c	U_s	$U_{\text{teórico}}$	U_{imo} [UI/g _{suporte}]	E_{imo} [%]	R_a [%]	η [%]
Accurel [®] MP1000	378	32	346	10,0	92	3	3
PS/PS 4	353	169	184	9,0	52	5	3
PS/PMMA 2	390	300	90	12,0	23	13	3
PS/PS-co-PC	378	141	237	21,0	63	9	6
PMMA/PS 2	390	99	291	22,0	75	8	6
PMMA/PS 4	390	200	190	26,0	49	14	7
PMMA/PMMA 1h	378	170	208	16,0	55	8	4
PMMA/PMMA 2h	378	200	178	35,0	47	20	9
PMMA/ PMMA-BV	350	154	196	36,0	56	18	10
PMMA/ PMMA-BV SAP	390	290	100	30,0	26	30	8
PS-DVB/PS	350	19	331	7,0	95	2	2
PS-DVB/PS-DVB	350	16	334	15,0	95	4	4
PS/PS-DVB	350	22	328	36,0	94	11	10
PMMA-DVB/ PMMA	353	59	294	51,0	83	17	14
PMMA-DVB/ PMMA-DVB	353	90	263	120,0	75	46	34
PMMA/ PMMA-DVB	350	56	294	29,0	84	10	8

O suporte casca-núcleo de PS teve uma diminuição da eficiência de imobilização, retenção de atividade e rendimento de imobilização. Como a área específica não era muito elevada, o suporte saturou com o aumento da carga, levando à formação de multicamadas de enzimas e dificultando a transferência de massa. Em relação, ao suporte PS/PS-co-PC, houve uma queda considerável nos parâmetros de imobilização, provavelmente também consequência da pequena área específica. A mesma situação explica o desempenho dos suportes PS/PMMA 2 e PMMA/PS 4. O polímero PMMA/PS 2, apesar da diminuição da eficiência de imobilização, apresentou um aumento na retenção de atividade e, portanto, deve conseguir suportar maiores cargas enzimáticas.

Os suportes com base de PMMA (incluindo os que apresentam benzoato de vinila na composição) não apresentaram um bom desempenho para altas cargas enzimáticas, pois a eficiência de imobilização é baixa, devido às pequenas áreas específicas. Apesar disso, a retenção de atividade foi sempre melhor para as cascas à base de PMMA.

Os suportes casca-núcleo contendo divinilbenzeno apresentaram bons parâmetros de imobilização. As partículas com base de poli(estireno) tiveram elevadas eficiências de imobilização; entretanto, a retenção de atividade e o rendimento de imobilização não foram altos. Já os suportes com base de poli(metacrilato de metila) exibiram os melhores resultados, com destaque para PMMA-DVB/PMMA-DVB. A queda na retenção de atividade pode ser explicada pela formação de agregados, modificação na estrutura da enzima e dificuldades de transferência de massa (FREIRE, 1988; SALIS *et al.*, 2003; SALIS *et al.* 2008). Esses melhores parâmetros de imobilização são consequência do aumento da área específica e da estrutura do material (conforme detalhado no Capítulo 5), ocasionados pela reticulação das cadeias poliméricas pelo divinilbenzeno. Particularmente, para os polímeros com base de PMMA e DVB, a sua composição e consequentemente a sua menor hidrofobicidade, parecem ser mais adequadas para esse tipo de reação (hidrólise), pois a enzima sofre uma menor distorção quando interage com esse tipo de material e permanece em uma conformação mais adequada para a entrada do substrato.

A adição de divinilbenzeno provocou importantes mudanças estruturais nos suportes casca-núcleo, influenciando positivamente na imobilização de CAL-B, já que as áreas específicas eram maiores (apesar de ocorrer uma diminuição dos diâmetros médios de poro). Esse comportamento é semelhante ao encontrado por CHEN *et al.* (2007a) na imobilização de CAL-B nos suportes comerciais Amberlite e Amberchrom. As maiores atividades foram encontradas nos materiais com menores diâmetros de poros e menores tamanhos de partículas (a adição de DVB também torna os tamanhos de partículas menores, como foi detalhado no Capítulo 5).

O Accurel não exibiu um bom desempenho e, apesar da eficiência de imobilização ter sido alta, as enzimas imobilizadas exibiram baixa retenção de atividade.

Dessa forma, para a próxima etapa, envolvendo uma carga inicial de enzima em torno de 800 UI, os seguintes suportes foram selecionados: PS-DVB/PS, PS-DVB/PS-DVB, PS/PS-DVB, PMMA-DVB/PMMA, PMMA-DVB/PMMA-DVB, PMMA/PMMA-DVB e PMMA/PS 2. A carga inicial de enzima de 800 UI permite avaliar a capacidade de carga do suporte e aumentar o valor do parâmetro U_{imo} . Contudo, os parâmetros de imobilização podem diminuir pela formação de camadas duplas de enzima, bloqueando o sítio ativo e dificultando a transferência de massa de produtos e substratos. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 6.4.

Tabela 6.4: Parâmetros de imobilização (Atividade enzimática de entrada/ $U_c = 800UI$).

Suporte	U_c	U_{imo} [UI/g _{suporte}]	E_{imo} [%]	R_a [%]	η [%]
Accurel [®] MP1000	780	25	95	3	3
PMMA/PS 2	780	25	79	4	3
PS-DVB/PS	780	22	83	3	3
PS-DVB/PS-DVB	780	32	100	4	4
PS/PS-DVB	780	37	74	6	4
PMMA-DVB/PMMA	780	105	54	25	14
PMMA-DVB/PMMA-DVB	780	140	81	22	18
PMMA/PMMA-DVB	780	60	57	14	8

A eficiência de imobilização permaneceu alta, com exceção dos suportes PMMA-DVB/PMMA e PMMA/PMMA-DVB, que tiveram a eficiência reduzida, indicando que atingiram a sua saturação. Nos suportes contendo poli(estireno), o que apresentou melhores resultados foi PS-DVB/PS-DVB, pois a eficiência de imobilização permaneceu alta e a retenção de atividade não modificou. As partículas de PMMA-DVB/PMMA-DVB exibiram os melhores parâmetros de imobilização. Como dito anteriormente, além da elevada porosidade, a sua composição química mostrou-se mais adequada para esse tipo de reação enzimática.

Com isso, os melhores desempenhos foram obtidos com suportes contendo divinilbenzeno no núcleo e na casca. Essas amostras suportam uma carga enzimática ainda maior, devido à elevada área específica. A intenção de adicionar DVB para modificar a estrutura do material mostrou-se adequada para a imobilização da lipase de CAL-B. Além disso, esses materiais apresentaram um comportamento superior ao suporte comercial Accurel.

6.3. Reações de Esterificação

O comportamento da lipase B de *Candida antarctica* imobilizada nos suportes casca-núcleo em reações de esterificação entre ácido oléico e etanol também foi avaliado. Inicialmente, a carga inicial de enzima estava em torno de 400 UI. O desempenho desses materiais foi comparado com o do biocatalisador comercial Novozyme 435, além do suporte comercial Accurel. Os valores da atividade de esterificação são apresentados na Tabela 6.5.

As maiores atividades de esterificação ocorreram em suportes com as maiores áreas específicas, pois há um aumento na porcentagem da área do suporte em que a enzima pode ser encontrada, facilitando a difusão do substrato e do produto durante a dosagem da atividade (CHEN *et al.*, 2007). Esses suportes também apresentaram bons valores de eficiência de imobilização.

Os suportes anteriormente testados com carga inicial de enzima de 800UI, também foram submetidos à reação de esterificação, conforme ilustra a Tabela 6.6.

Tabela 6.5: Atividade de Esterificação (Atividade enzimática de entrada/Uc = 400UI).

Suporte	Atividade de Esterificação [UI/g_{suporte}]
Accurell [®] MP1000	1070
Novozyme 435	2167
PS casca-núcleo	338
PS/PMMA 2	170
PS/PS-co-PC	188
PMMA/PS 2	1617
PMMA/PS 4	533
PMMA/PMMA 1h	319
PMMA/PMMA 2h	96
PMMA/PMMA-BV	219
PMMA/PMMA-BV SAP	112
PS-DVB/PS	578
PS-DVB/PS-DVB	1088
PS/PS-DVB	620
PMMA-DVB/PMMA	1187
PMMA-DVB/PMMA-DVB	805
PMMA/PMMA-DVB	944

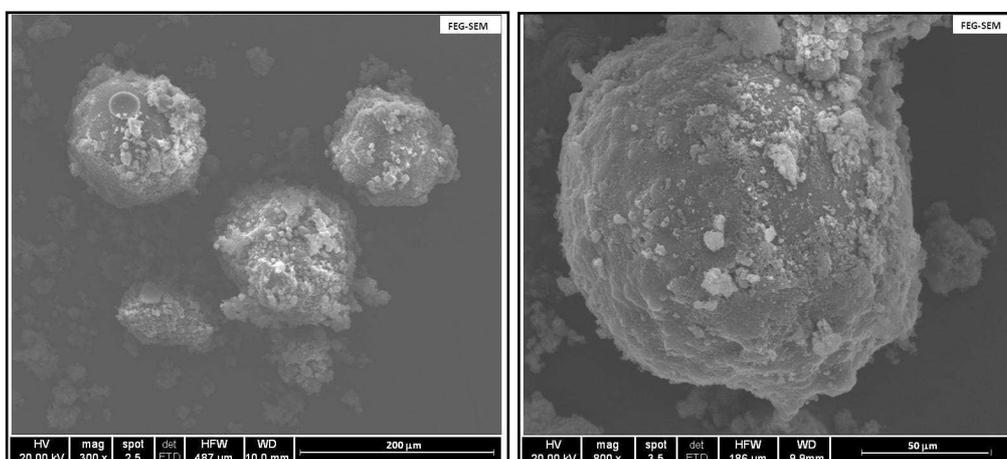
Tabela 6.6: Atividade de Esterificação (Atividade enzimática de entrada/Uc = 800UI).

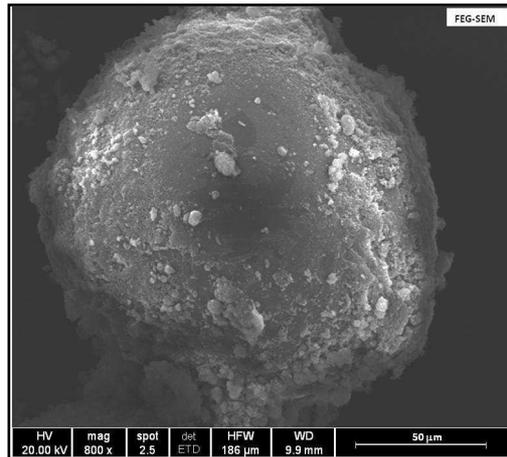
Suporte	Atividade de Esterificação [UI/g_{suporte}]
Accurell [®] MP1000	711
Novozyme 435	2167
PMMA/PS 2	547
PS-DVB/PS	633
PS-DVB/PS-DVB	1809
PS/PS-DVB	953
PMMA-DVB/PMMA	373
PMMA-DVB/PMMA-DVB	800
PMMA/PMMA-DVB	866

O Accurel e os suporte PMMA/PS 2 e PMMA-DVB/PMMA apresentaram redução da atividade de esterificação, provavelmente pela formação de várias camadas de enzima, dificultando a transferência de massa (FREIRE, 1988; SALIS *et al.*, 2003; SALIS *et al.* 2008). A atividade de esterificação dos biocatalizadores PS-DVB/PS, PMMA-DVB/PMMA-DVB e PMMA/PMMA-DVB permaneceram praticamente inalterados. Os suportes com base de poli(estireno), PS-DVB/PS-DVB e PS/PS-DVB aumentaram a sua atividade de esterificação com o aumento da carga de enzima, sendo que o material com DVB no núcleo e na casca aumentou consideravelmente a sua atividade, resultando em valores próximos ao da lipase comercial de *Candida antarctica* imobilizada.

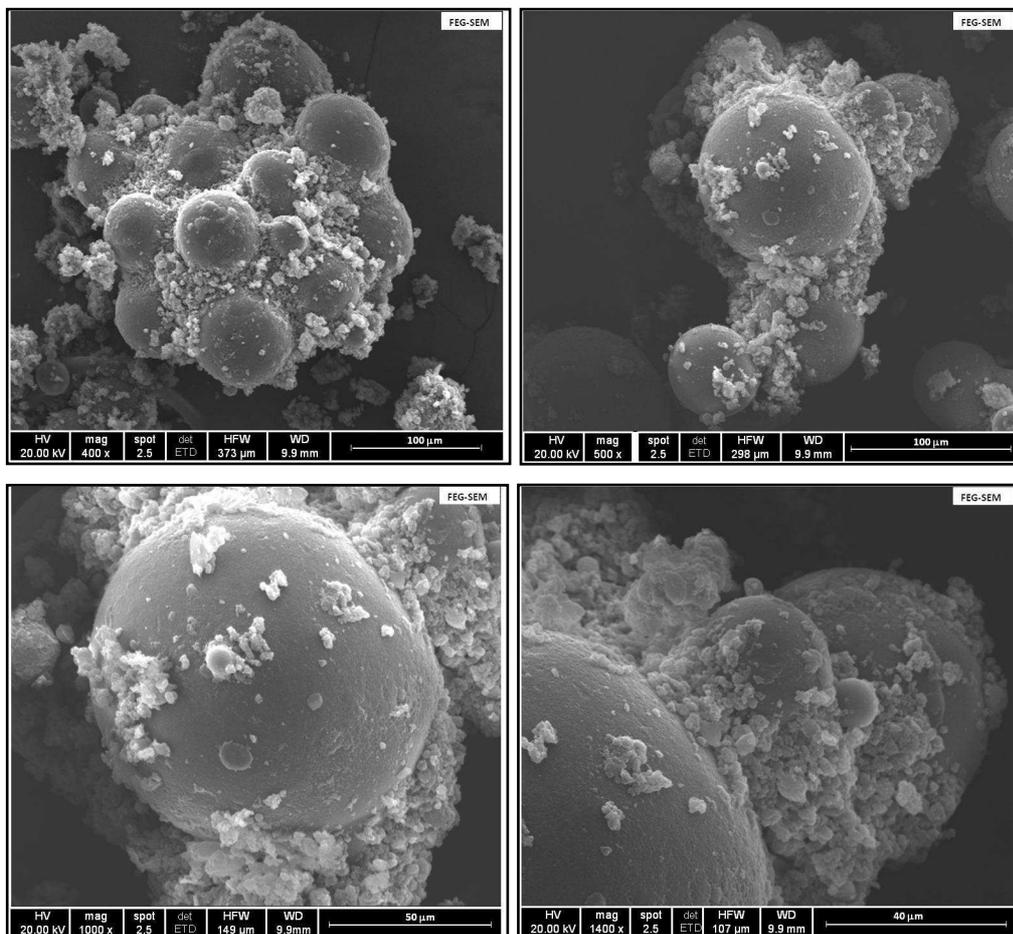
Diante do que foi apresentado nessa seção, pode-se concluir que os suportes desenvolvidos pela polimerização em suspensão e emulsão são bastante adequados para imobilização de enzimas, exibindo parâmetros de imobilização e atividades enzimáticas similares e até superiores a de materiais disponíveis comercialmente. Além disso, os valores de área específica e de diâmetro médio de poro são comparáveis aos de alguns materiais que estão comercialmente disponíveis (AL-DURI e YONG, 2000; PANZAVOLTA *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2008).

Pelo que foi exposto, os melhores suportes, que apresentam as maiores áreas específicas e os melhores parâmetros de imobilização e atividades de hidrólise e de esterificação, foram PS-DVB/PS-DVB e PMMA-DVB/PMMA-DVB. Foram obtidas algumas micrografias desse material, após estarem com a CAL-B imobilizada, conforme está ilustrado na Figura 6.1.





(A)



(B)

Figura 6.1: Micrografias de (A) PS-DVB/PS-DVB e (B) PMMA-DVB/PMMA-DVB com CAL-B.

A imobilização de CAL-B nesses suportes não provocou nenhuma modificação na sua estrutura, principalmente no suporte PS-DVB/PS-DVB, indicando que a adição

de DVB permite que as partículas fiquem com maior resistência química. As partículas poliméricas do suporte PMMA-DVB/PMMA-DVB, apresentam-se aglomeradas após a adição da enzima, o que não parece comprometer o desempenho.

6.4. Estabilidade de Estocagem

O teste de estabilidade de estocagem foi realizado com alguns dos suportes casca-núcleo produzidos, a fim de verificar se a enzima imobilizada mantinha a sua atividade por um período de tempo. Os biocatalisadores ficavam estocados (a 30 °C) e periodicamente sua atividade de hidrólise era determinada. A Figura 6.2 ilustra a estabilidade de estocagem. Pode-se perceber, que os suportes avaliados conservaram 100% de sua atividade, ao final de 30 dias. Isso indica que os polímeros casca-núcleo desenvolvidos são adequados para a aplicação como suporte para imobilização de enzimas.

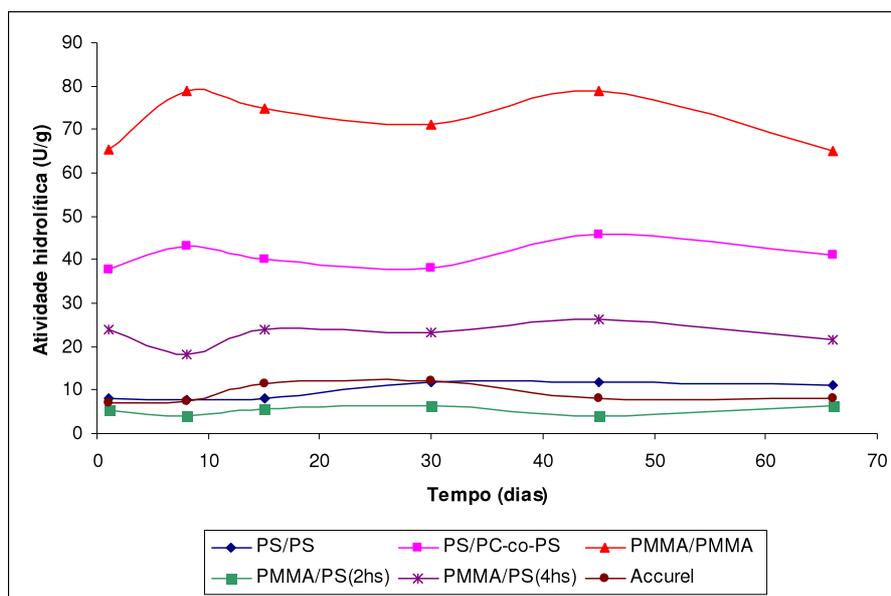


Figura 6.2: Teste de estabilidade de estocagem.

6.5. Análise Econômica Simplificada

Nessa seção, será feita uma análise do custo de produção das partículas casca-núcleo de PS-DVB/PS-DVB e PMMA-DVB/PMMA-DVB, que exibiram os melhores

resultados. As Tabelas 6.7 e 6.8 mostram um balanço econômico simplificado do processo.

Tabela 6.7: Valores de matéria-prima para produção dos suportes casca-núcleo.

MATÉRIA-PRIMA			
Reagentes	Quantidade [g]	Preço Reagente [R\$]	Preço Total [R\$]
Estireno	150	94,00/l	15,50
Metacrilato de Metila	150	148,50/l	23,60
Divinilbenzeno	50	612,00/l	33,50
Poli(álcool vinílico)	3,0	62,50/kg	0,19
Peróxido de Benzofla	4,0	357,80/kg	1,43
Lauril Sulfato de Sódio	2,5	41,86/kg	0,10
Persulfato de Potássio	0,3	108,40/kg	0,03
Bicarbonato de Sódio	0,3	7,92/kg	0,002
PS-DVB/PS-DVB: R\$0,51/g			
PMMA-DVB/PMMA-DVB: R\$0,65/g			

Tabela 6.8: Valores dos custos operacionais para produção dos suportes casca-núcleo.

CUSTOS OPERACIONAIS			
Item	Quantidade	Preço [R\$]	Preço Total [R\$]
Energia	500 kWh	0,20/kWh	100,00
Hora-Homem	40 h	50,00/h	2000,00
Análises	5	100,00/análise	500,00
Obsolescência de Equipamentos	5 dias	100/dia	500,00
Manutenção	5 dias	100/dia	500,00
TOTAL			3600,00
TAXAS (Impostos)	50%		1800,00
CUSTO FINAL: R\$ 5400,00			

A análise dos valores apresentados nas Tabelas 6.7 e 6.8 mostram que o maior custo para a produção de suportes poliméricos está relacionado com os custos operacionais. É importante ressaltar que os custos operacionais listados são praticamente os mesmos para uma produção de polímero na faixa de 100g a 10kg. Dessa forma, quanto maior a quantidade de polímero a ser produzida, menores serão esses gastos. Por exemplo: enquanto que a produção de 100g do suporte PS-DVB/PS-DVB custaria R\$ 54,51/g; a produção de 10 kg custaria R\$ 1,05/g (e ainda, se for incluído um lucro de 100%, o preço do suporte seria de R\$2,10/g).

O preço desses suportes casca-núcleo foi superior ao do suporte comercial Accurel[®] MP1000, que é de EUR28,20/kg (MEMBRANA GmbH, Accurel Systems, 2011), correspondendo a R\$62,30/kg ou R\$0,06/g. Entretanto, os parâmetros de imobilização dos suportes casca-núcleo são consideravelmente superiores ao do Accurel, o que conduz a uma balanço de quantidade de enzima empregada favorável aos materiais desenvolvidos. É importante ressaltar que as enzimas têm um preço de mercado bastante elevado. O valor de mercado da lipase B de *Candida antártica* não foi fornecido pelo seu fabricante (Novozymes).

Para exemplificar o custo de produção de um biocatalisador, o valor da enzima foi retirado de CASTILHO *et al.*, (2000), sendo de US\$78,00/l (correspondendo a R\$123,32/l) para a lipase de *Penicillium restrictum*. Nas imobilizações realizadas no presente trabalho, para cada grama de suporte, utilizava-se 10 ml de solução de enzima; ou seja, o custo com a enzima seria de R\$1,23. Dessa forma, produzindo-se 100g de suporte casca núcleo (quantidade aproximada produzida por batelada), o biocatalisador com suporte de PS-DVB/PS-DVB, custaria R\$55,74; enquanto que o suporte de PMMA-DVB/PMMA-DVB, custaria R\$ 55,88. A Novozyme 435 custa R\$72,90/g (SIGMA ALDRICH, 2011). Apesar da enzima usada no cálculo não ser a mesma, o preço dos suportes casca-núcleo é inferior, indicando que é um material viável para a aplicação como suporte de imobilização de enzimas. Novamente, vale ressaltar, que a produção em larga escala dos polímeros casca-núcleo permite reduzir o seu valor final.

CAPÍTULO 7

CONCLUSÕES E SUGESTÕES

As partículas casca-núcleo produzidas pela polimerização em suspensão e emulsão apresentam características bastante peculiares, como a distribuição de massas molares largas e a porosidade elevada, que justifica seu uso como suporte de enzimas.

Partículas casca-núcleo contendo poli(metacrilato de metila) foram preparadas avaliando-se o efeito de duração da etapa de suspensão na faixa de 30 minutos a 2h. Constatou-se que as distribuições de massas molares são semelhantes e sempre exibem um comportamento bimodal e com elevados valores de M_w nas condições de reação realizadas. Quando se avaliam os valores de área específica, quanto menor a duração da etapa de polimerização em suspensão, mais poroso torna-se o material, por conta da maior eficiência de captura das partículas emulsificadas

A substituição do acetato de vinila pelo benzoato de vinila como comonômero, a fim de gerar uma casca porosa, mostrou-se bastante satisfatória. O resultado confirmou a hipótese de BESTETI (2009), de que a porosidade da casca está diretamente relacionada com a temperatura de transição vítrea do polímero formado em emulsão. A casca contendo benzoato de vinila era consideravelmente porosa, exibindo um recobrimento satisfatório do núcleo. Além disso, a saponificação desse material levou à modificação de algumas propriedades texturais, como aumento da área específica, indicando que a saponificação pode ser usada para modificar a estrutura química e morfológica do material. Nesse sentido, a produção de um material mais poroso e com maior diâmetro médio de poro após a saponificação indicou que de fato o anel aromático da estrutura do benzoato de vinila pode ser removido após a saponificação.

A adição de divinilbenzeno como agente reticulante no meio de reação modificou completamente a estrutura das partículas casca-núcleo. A partícula final apresenta morfologia esférica mais regular e aparência mais compacta. A casca apresenta aspecto mais espesso (quando comparada com as partículas casca-núcleo sem DVB), com completo recobrimento do núcleo e uma porosidade bem maior, medida em termos do aumento da área específica. De maneira geral, o diâmetro médio de poro apresentou uma redução após serem reticuladas, em função do melhor empacotamento das partículas capturadas na casca. O material com DVB era insolúvel em tetrahidrofurano e isso confirma que de fato ele funciona como um agente reticulante.

Polímeros com núcleo de poli(estireno) e casca de poli(acetato de vinila-co-metacrilato de metila) foram preparados com a quantidade de metacrilato de metila variando de 40 a 90%, de forma a se verificar as características da casca se alteravam. Segundo BESTETI (2009), polímeros com essa composição e com 30% de metacrilato de metila, não tinham casca porosa, mas sim um filme ao redor do núcleo. Constatou-se que o aumento na quantidade de MMA conduziu à formação de materiais porosos, nos quais se podia perceber um recobrimento satisfatório do núcleo. Isso confirma que a Tg do material da casca é determinante para estabelecer a sua porosidade.

Modificações introduzidas nas receitas de polimerização permitiram perceber que, para o caso do poli(estireno) e da polimerização em suspensão/emulsão, existe uma vazão máxima de alimentação do monômero da emulsão (de 0,20 l/h nas condições analisadas nesse trabalho). Valores superiores a esse fazem com que as partículas de polímero fiquem instáveis, crescendo de forma descontrolada e fazendo com que a polimerização não atinja bons resultados. A concentração de emulsificante na emulsão também é uma variável importante e, quando empregada abaixo do valor de concentração micelar crítica, leva à formação de coágulos, pois a quantidade não é suficiente para estabilizar as partículas de polímero. Por isso, recomenda-se que a reação em emulsão seja conduzida em condições de avidez e na presença de excesso de emulsificante (em relação à CMC)

A aplicação desses materiais como suporte para a imobilização de lipase B de *Candida antarctica* mostrou-se muito satisfatória, pois os valores dos parâmetros de

imobilização e das atividades de hidrólise e de esterificação foram similares ao do biocatalisador comercial Novozyme[®] 435 e superiores aos obtidos com o suporte comercial Accurel[®] MP1000. Os suportes casca-núcleo que alcançaram os melhores valores foram aqueles preparados com casca e núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) e casca e núcleo de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno). Nessas partículas, os valores de área específica foram maiores (para o suporte de PS-DVB/PS-DVB, a área específica foi de 28,9 m²/g; e para PMMA-DVB/PMMA-DVB, a área específica foi de 12,6 m²/g) e a composição também se mostrou adequada para essa aplicação. Além disso, uma análise econômica simplificada desses melhores suportes comprova a sua viabilidade e o seu custo de produção (em escala maior que a de laboratório) é consideravelmente inferior ao da Novozyme 435.

7.1. Sugestões para Trabalhos Futuros

Para trabalhos futuros, sugere-se um estudo mais aprofundado das variações na concentração de emulsificante, concentração de iniciador e da vazão de alimentação do monômero da emulsão, de forma a explicar todos os fenômenos que ocorrem durante a polimerização combinada em suspensão e emulsão. Sugere-se variar as condições da polimerização em suspensão, como por exemplo, controlar o tamanho das partículas por meio de uma reação em batelada alimentada e também modificar a quantidade de iniciador utilizada, de forma a avaliar a formação do núcleo e, conseqüentemente as características finais da casca formada. A reação de saponificação do benzoato de vinila pode ser estudada de uma maneira mais completa, aumentando-se a quantidade de hidróxido de sódio empregada. Aumentar a quantidade de benzoato de vinila na casca, o que implica em modificar as condições reacionais e o iniciador empregado. Produzir materiais poliméricos com uma quantidade variada de agente reticulante, verificando as características da casca, como aumento da área específica e, também, a evolução da reticulação, à medida que se adiciona mais agente reticulante. Empregar as partículas casca-núcleo na imobilização de outras enzimas, adequando a composição do suporte às suas características e também avaliar outras reações enzimáticas após a sua suportação. Além disso, pode-se estudar novas metodologias de imobilização, de forma que essa ocorra durante a reação de polimerização (a ser realizada em condições mais amenas de temperatura).

APÊNDICE A

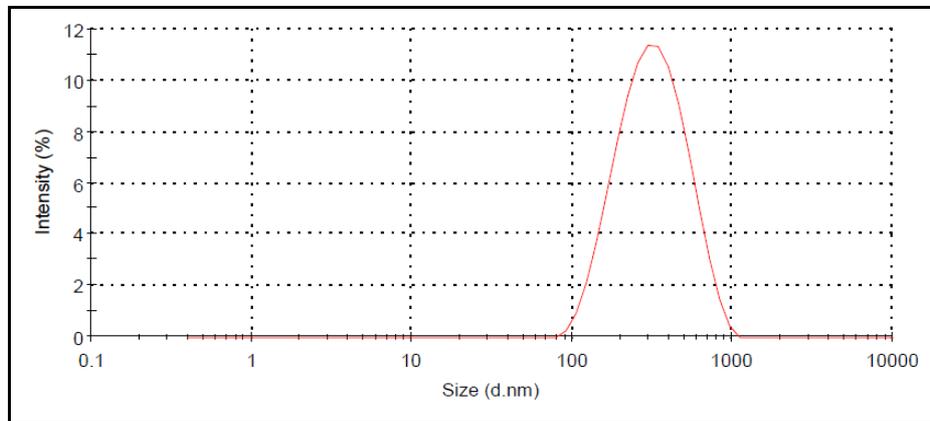


Figura A1: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante PMMA/PMMA 30 min.

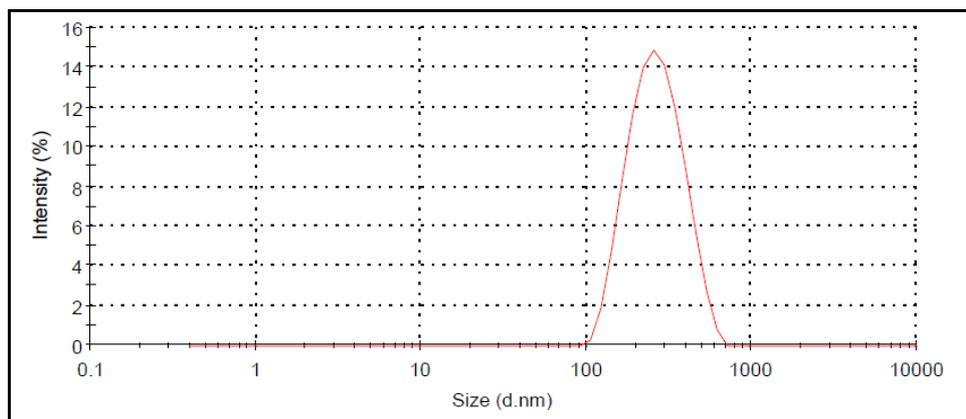


Figura A2: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA/PMMA 1h.

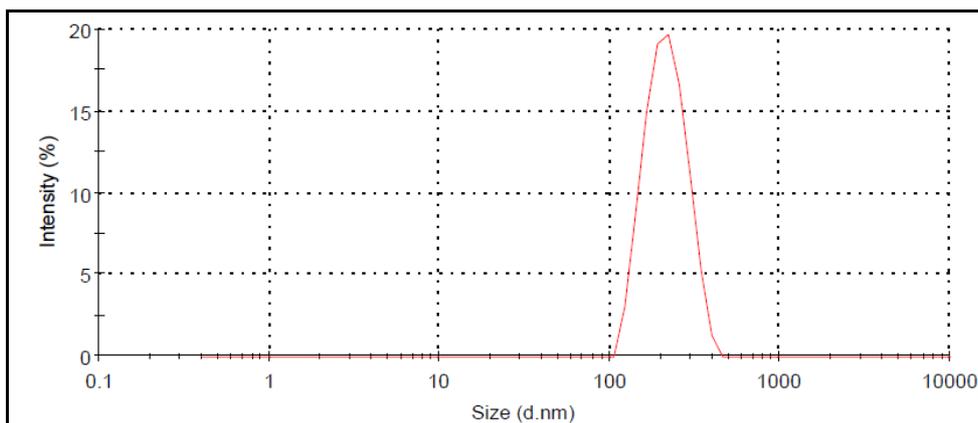


Figura A3: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA/PMMA-BV.

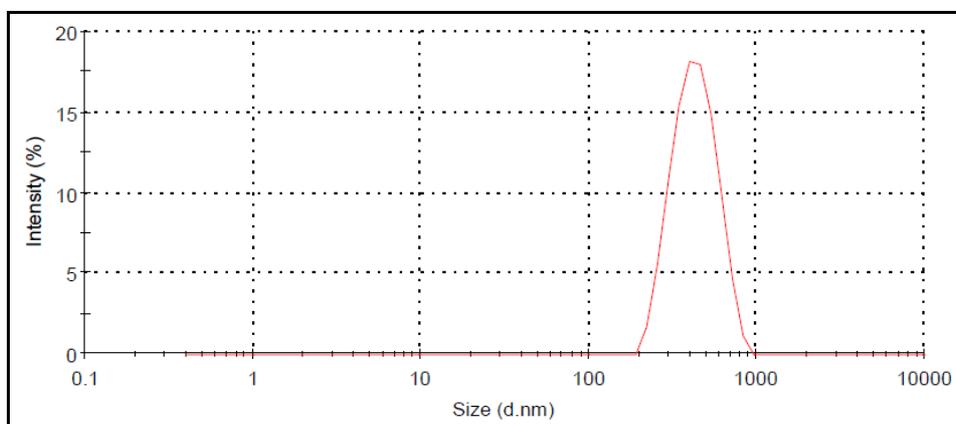


Figura A4: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PS-DVB/PS-DVB.

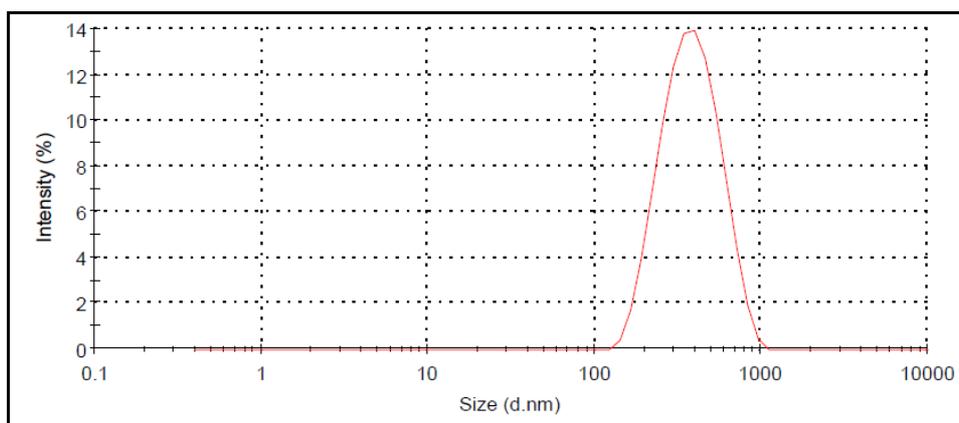


Figura A5: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PS/PS-DVB.

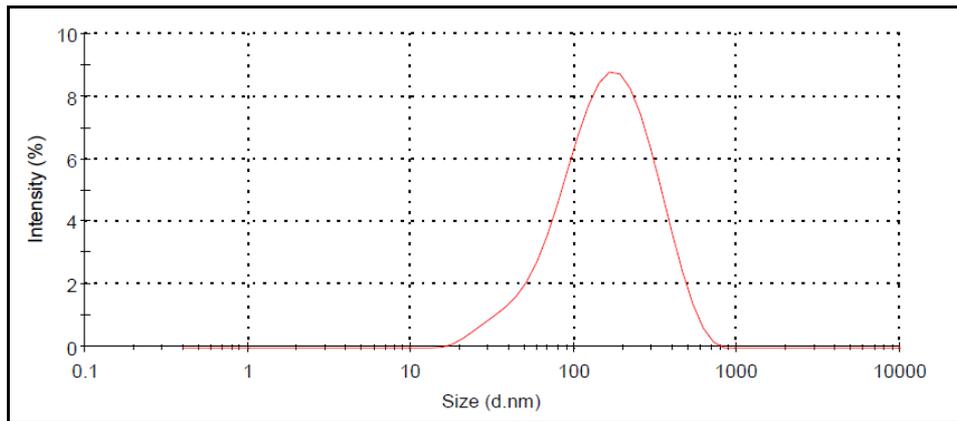


Figura A6: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA-DVB/PMMA.

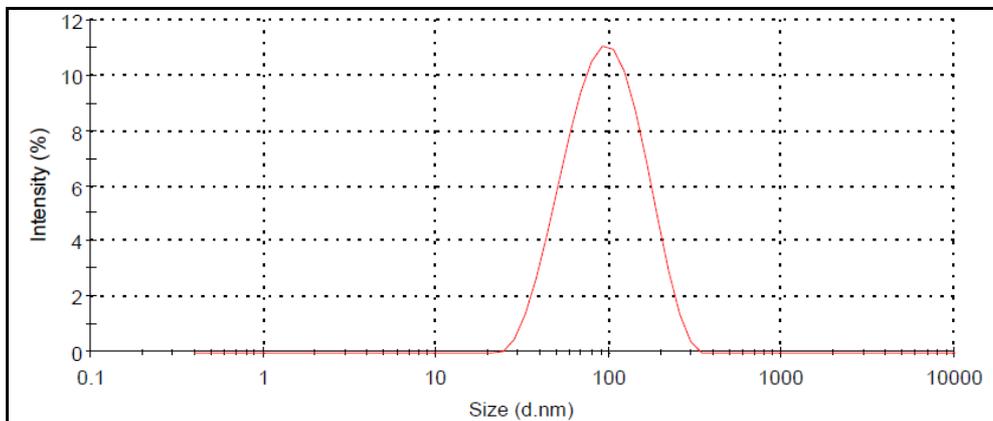


Figura A7: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA-DVB/PMMA-DVB.

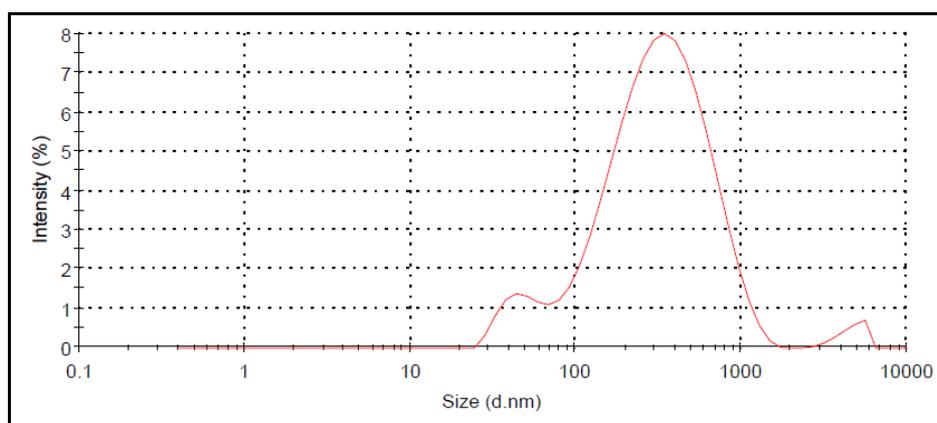


Figura A8: Distribuição de tamanhos de partícula do sobrenadante de PMMA/PMMA-DVB.

APÊNDICE B

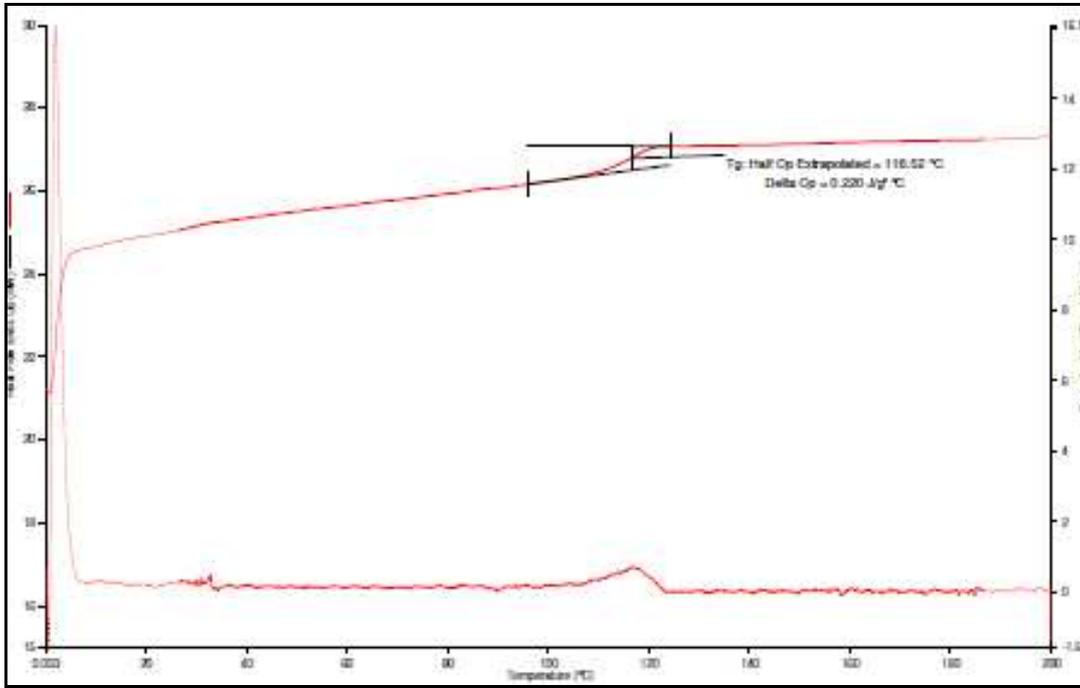


Figura B1: Curva de DSC de PMMA/PMMA 30 min.

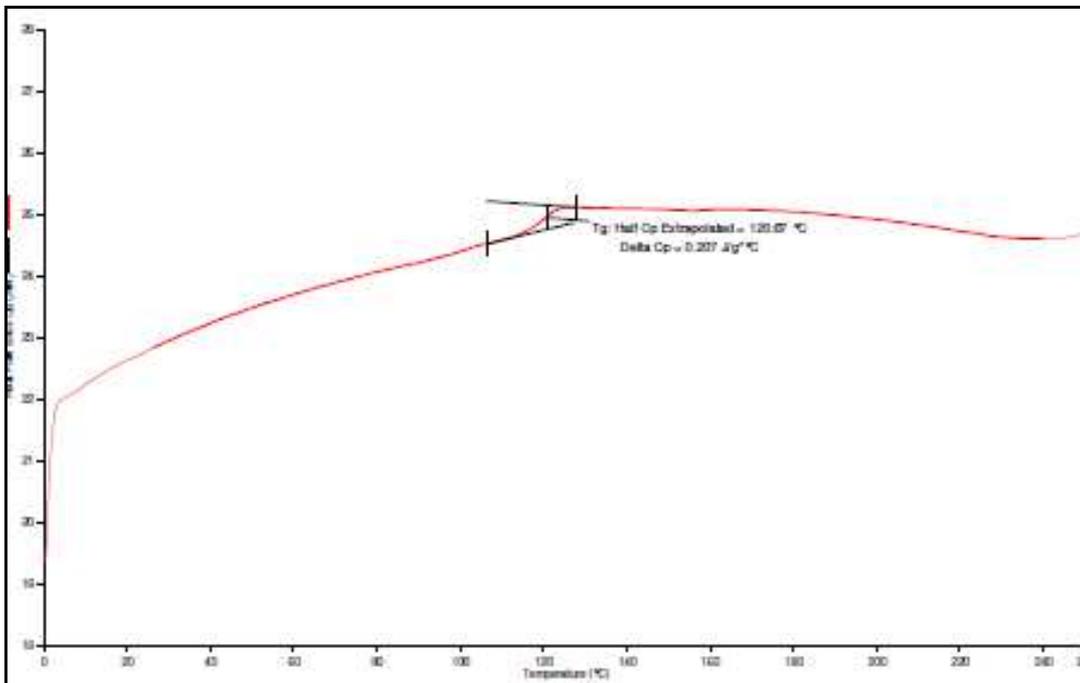


Figura B2: Curva de DSC de PMMA/PMMA 1h.

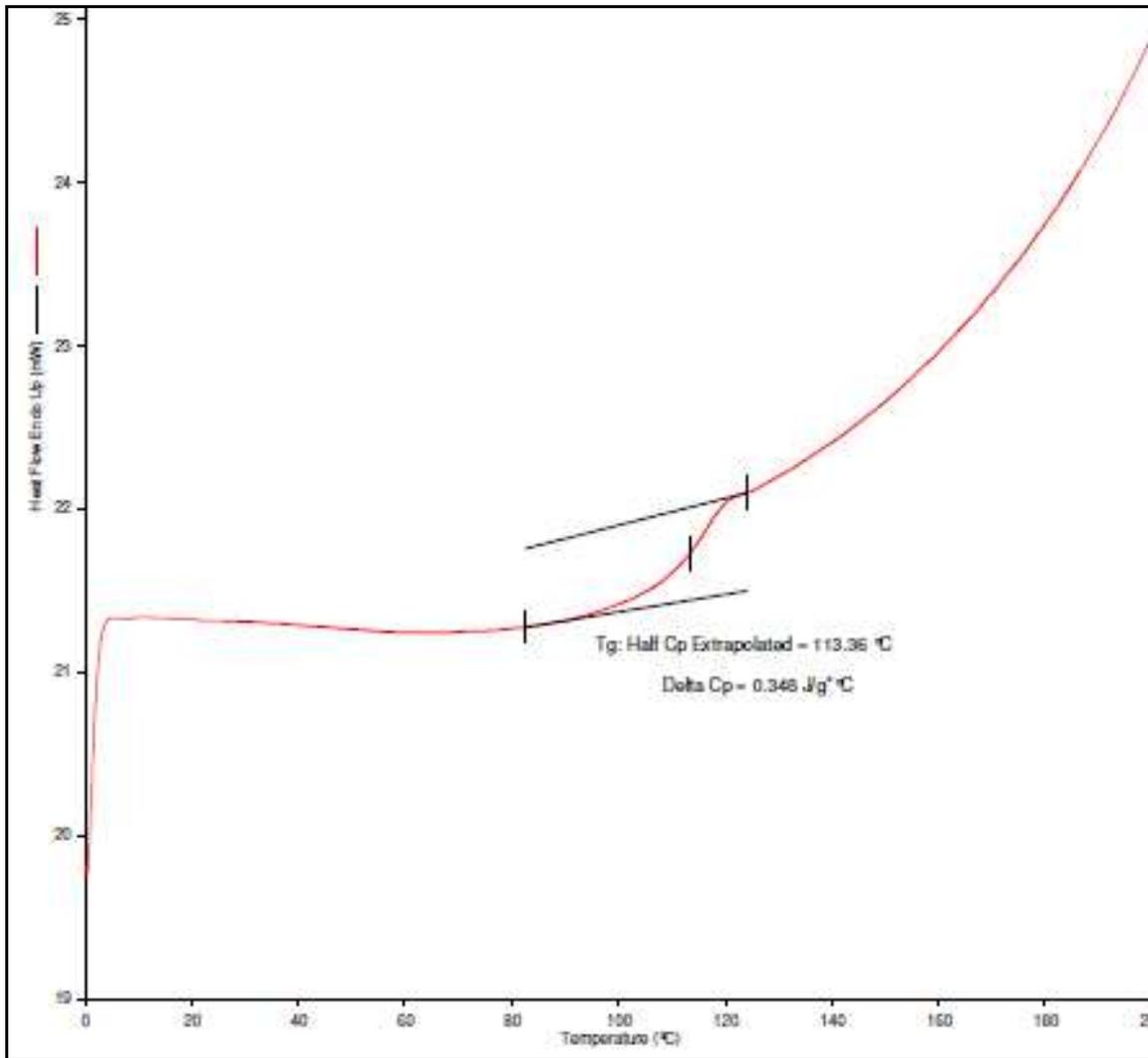


Figura B3: Curva de DSC de PMMA/PMMA 2h.

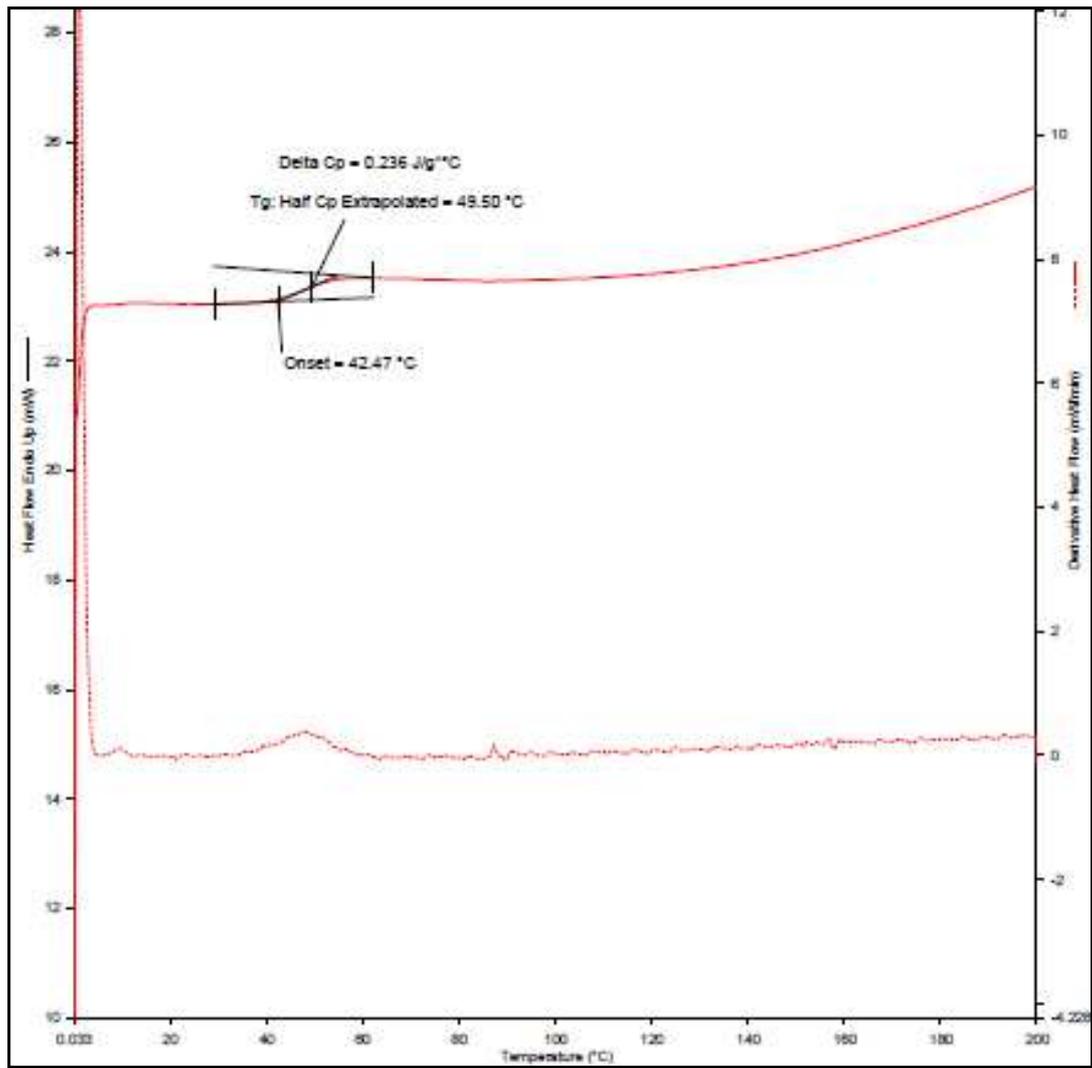


Figura B4: Curva de DSC de REC1.

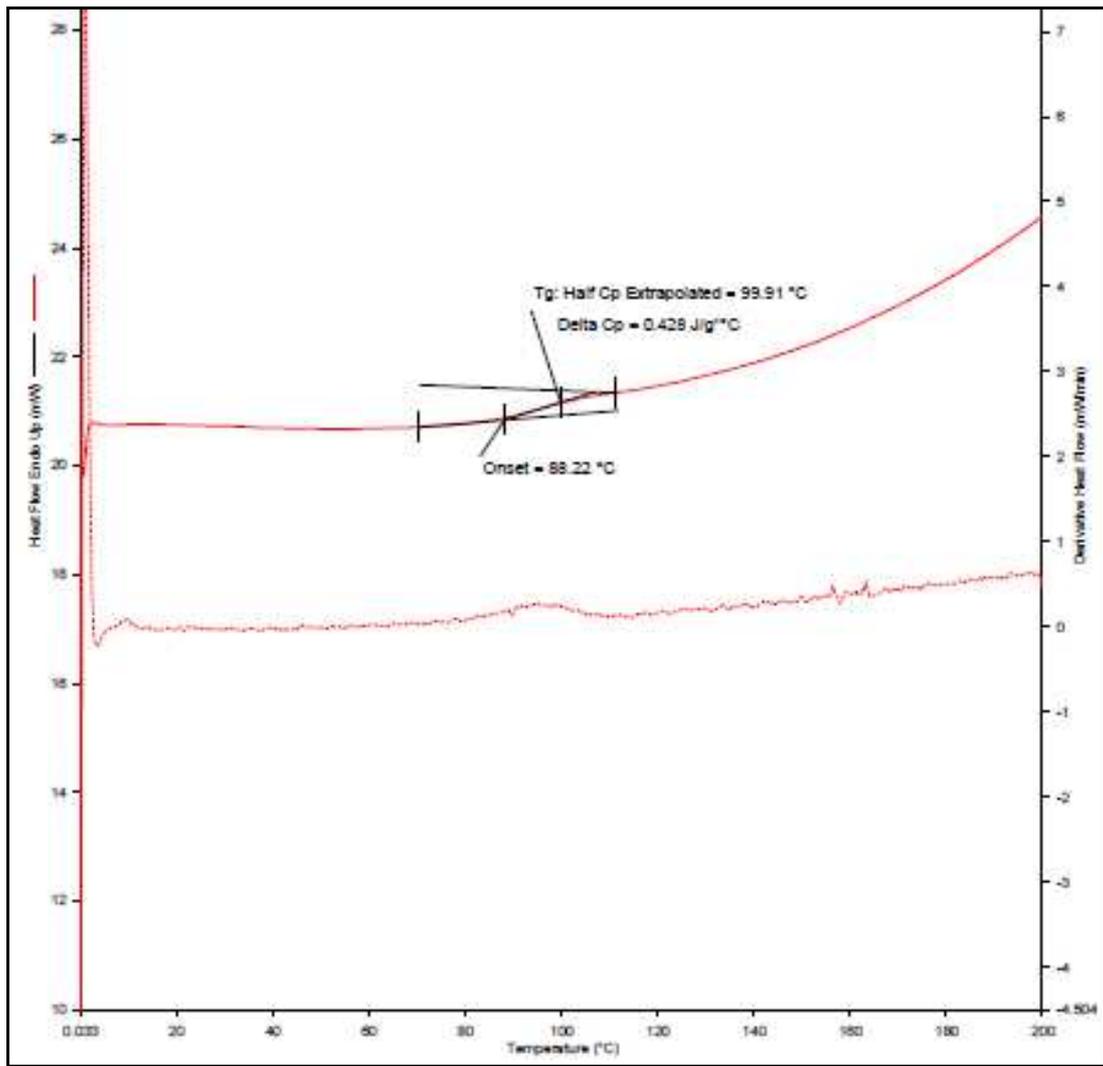


Figura B5: Curva de DSC de REC2.

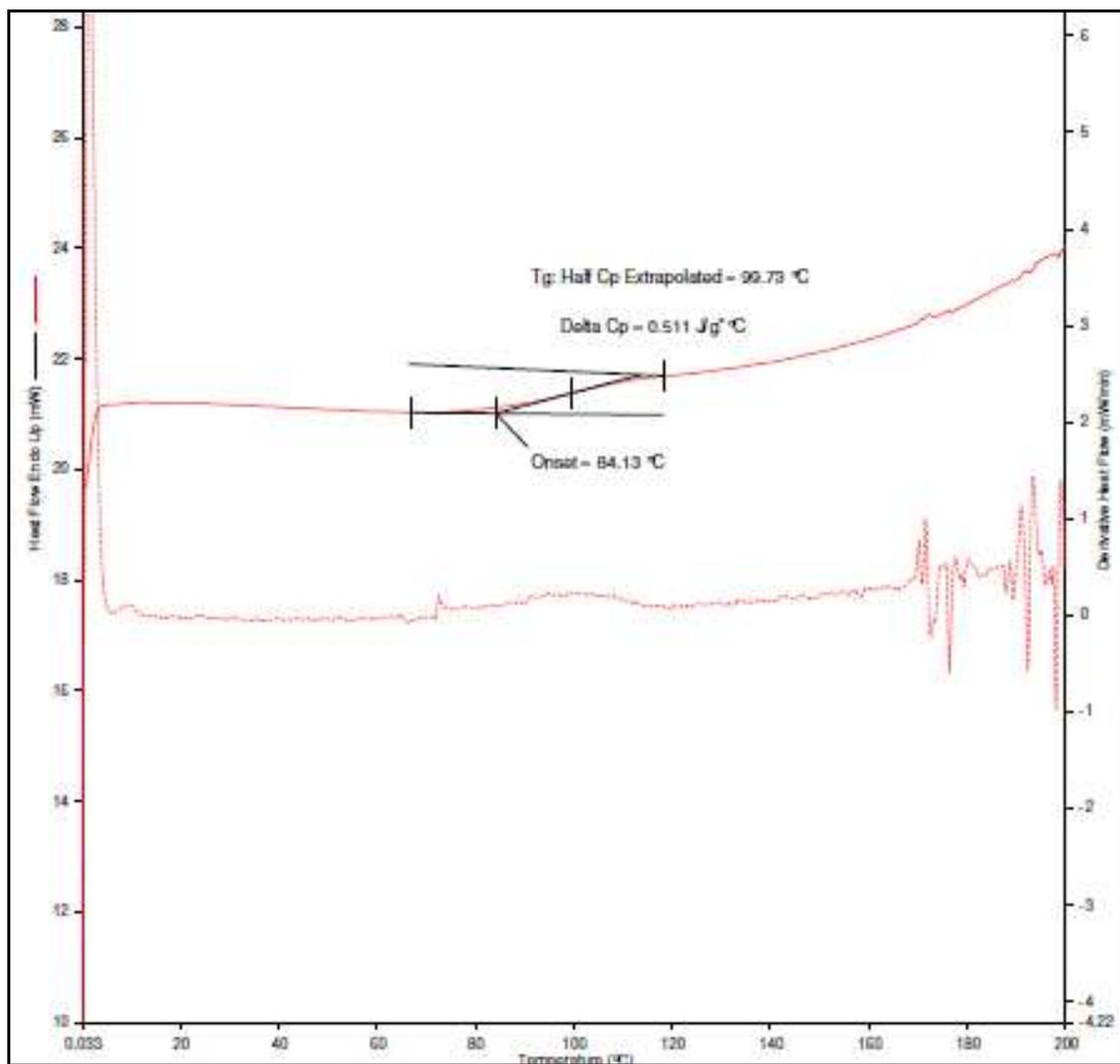


Figura B6: Curva de DSC de REC3.

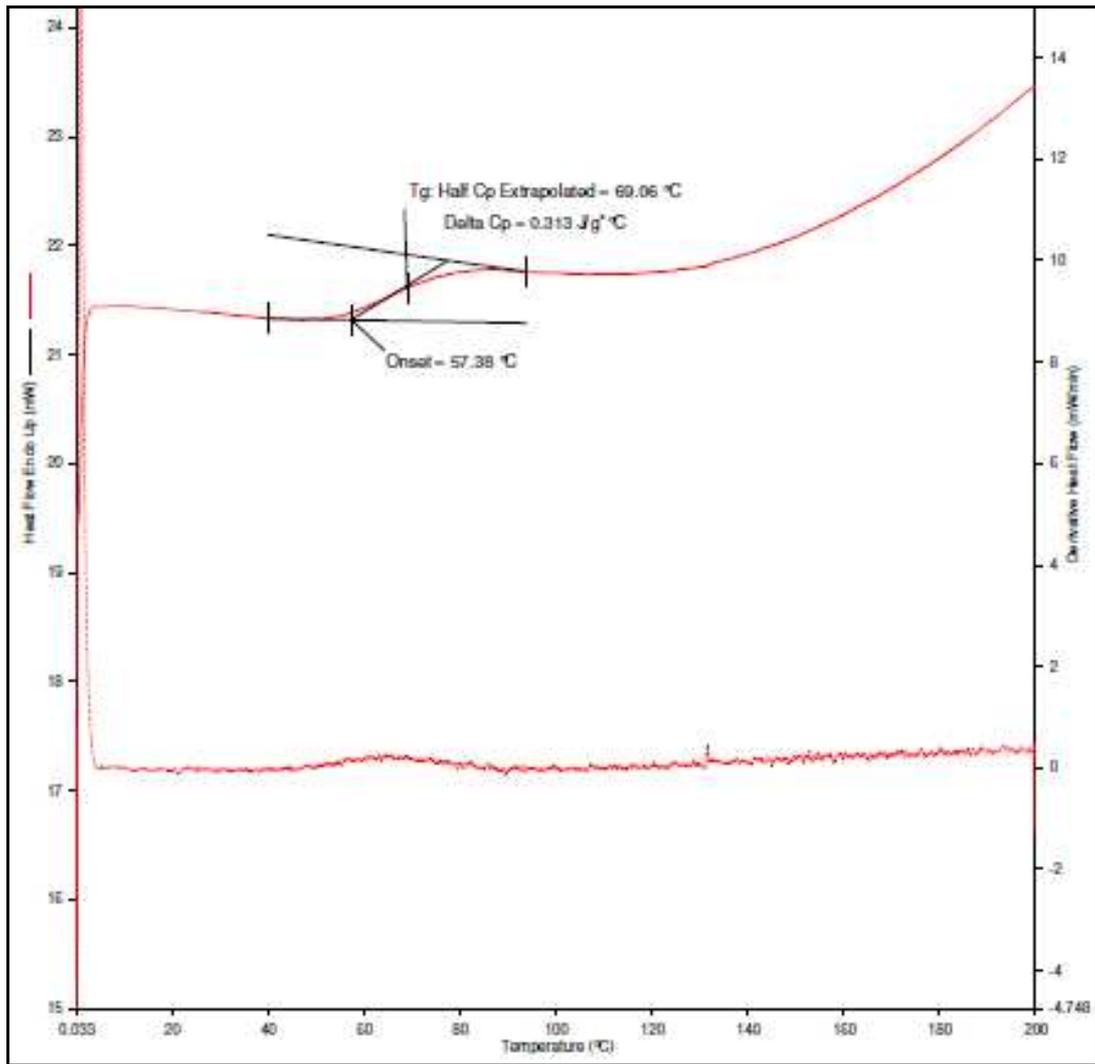


Figura B7: Curva de DSC de REC4.

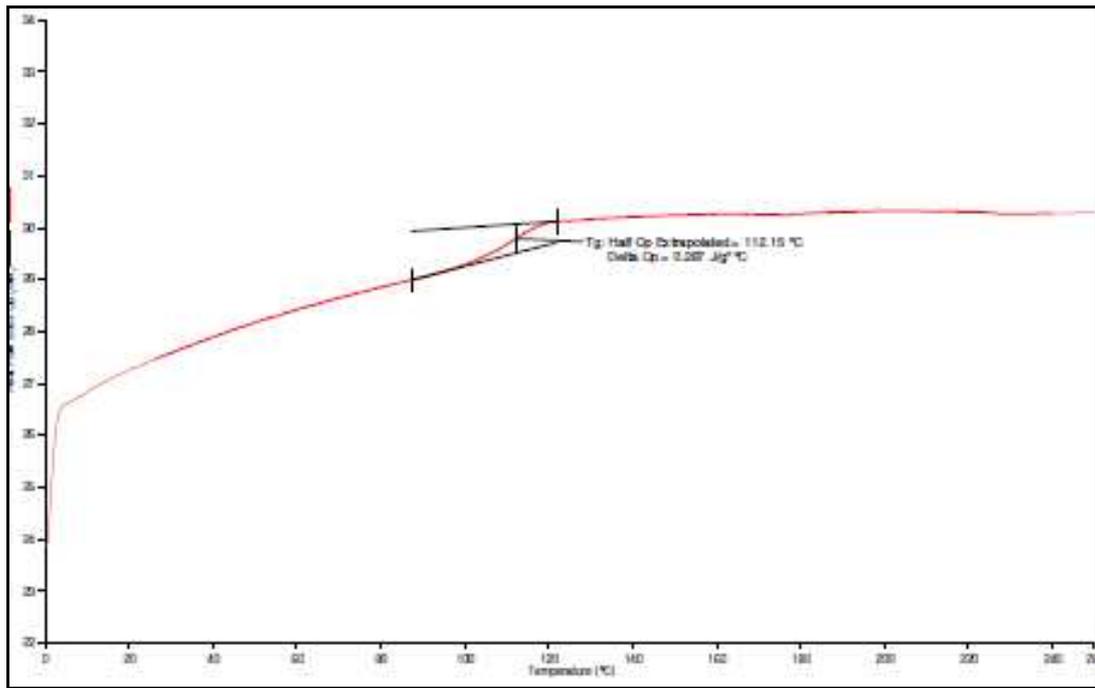


Figura B8: Curva de DSC de PMMA/PMMA-BV.

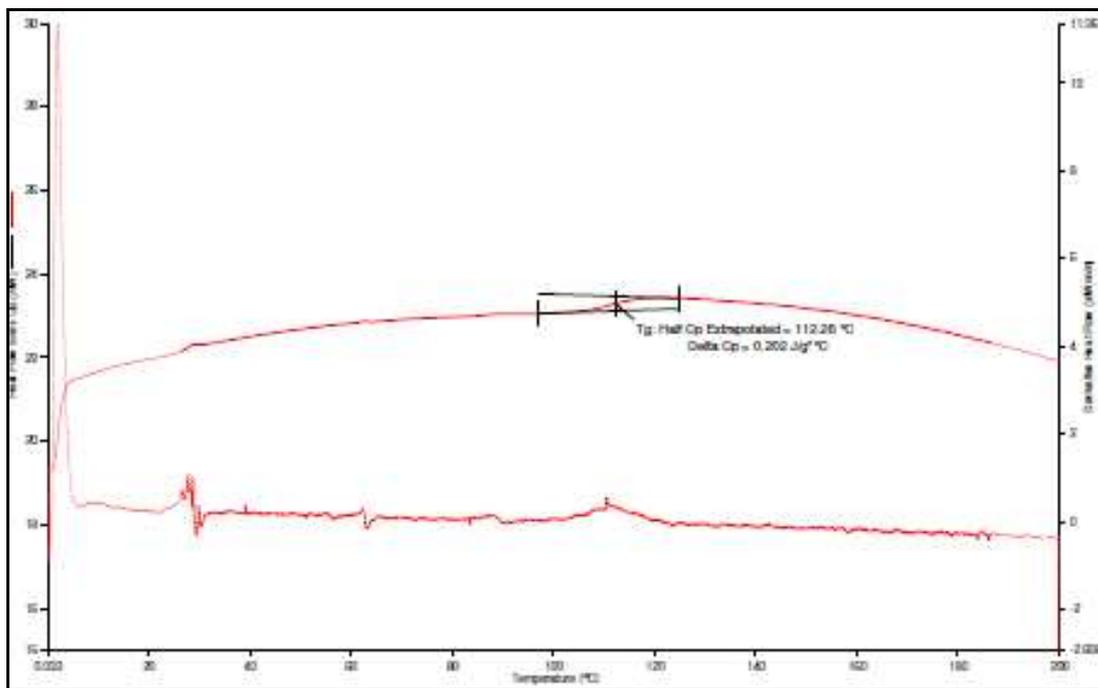


Figura B9: Curva de DSC de PMMA/PMMA-BV SAP.

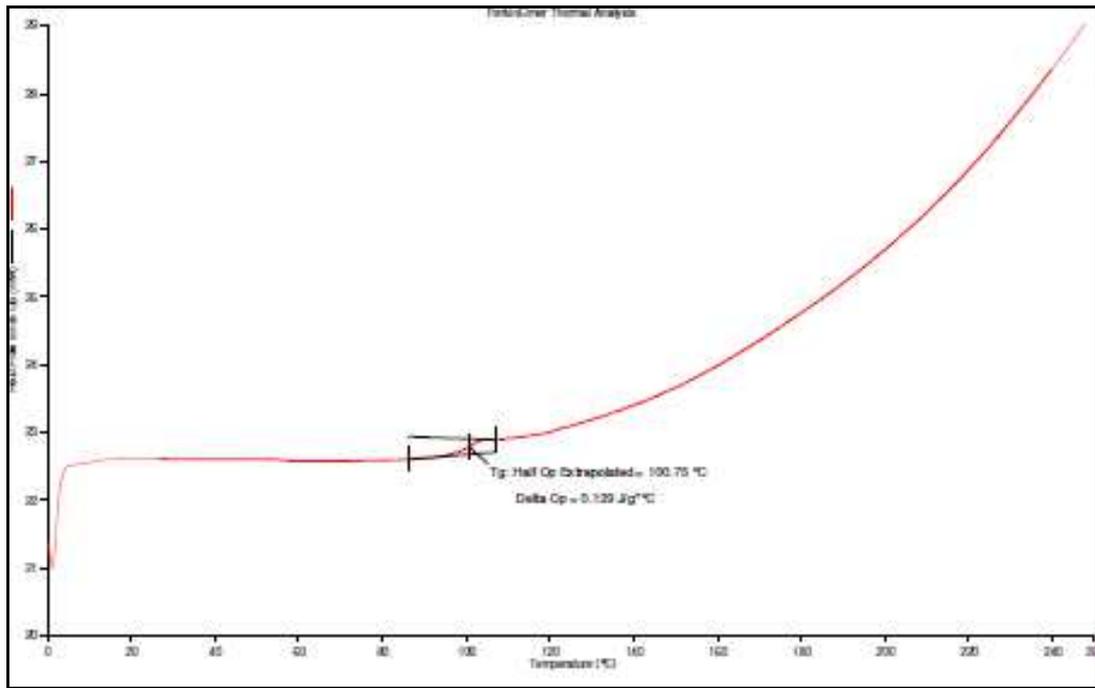


Figura B10: Curva de DSC de PS-DVB/PS.

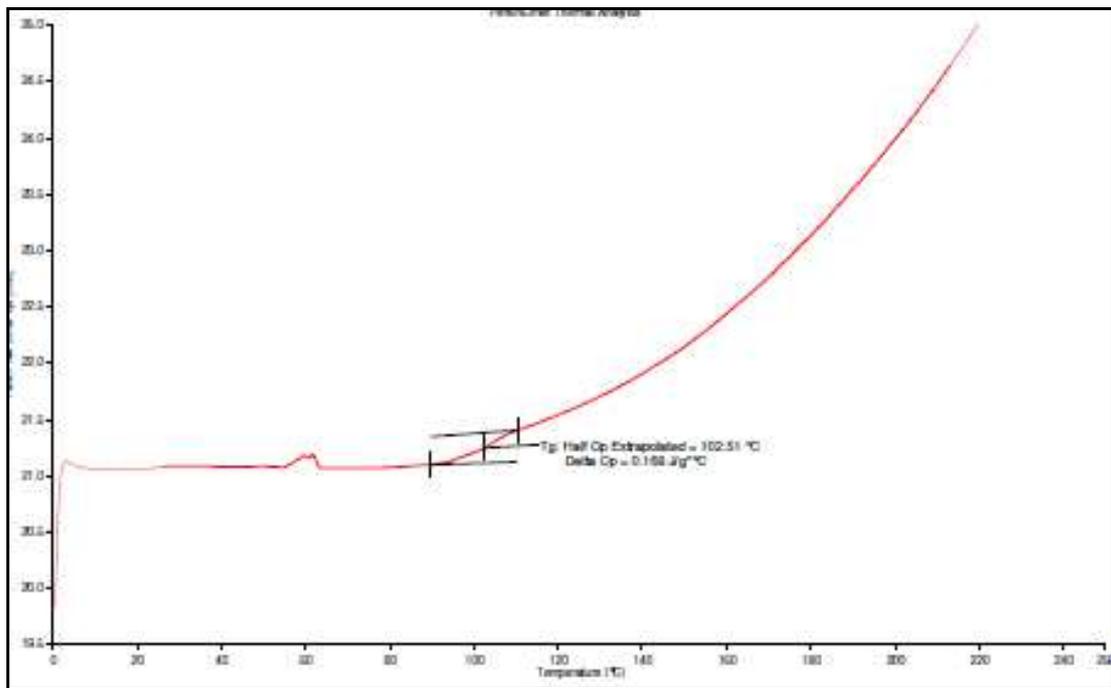


Figura B11: Curva de DSC de PS-DVB/PS-DVB.

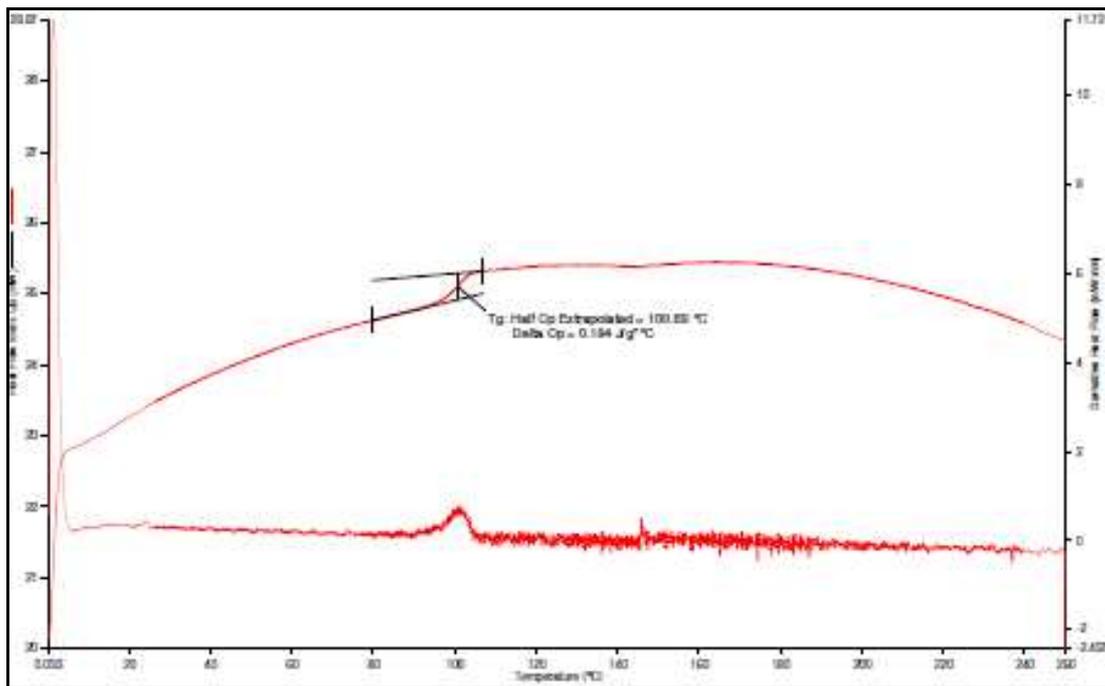


Figura B12: Curva de DSC de PS/PS-DVB.

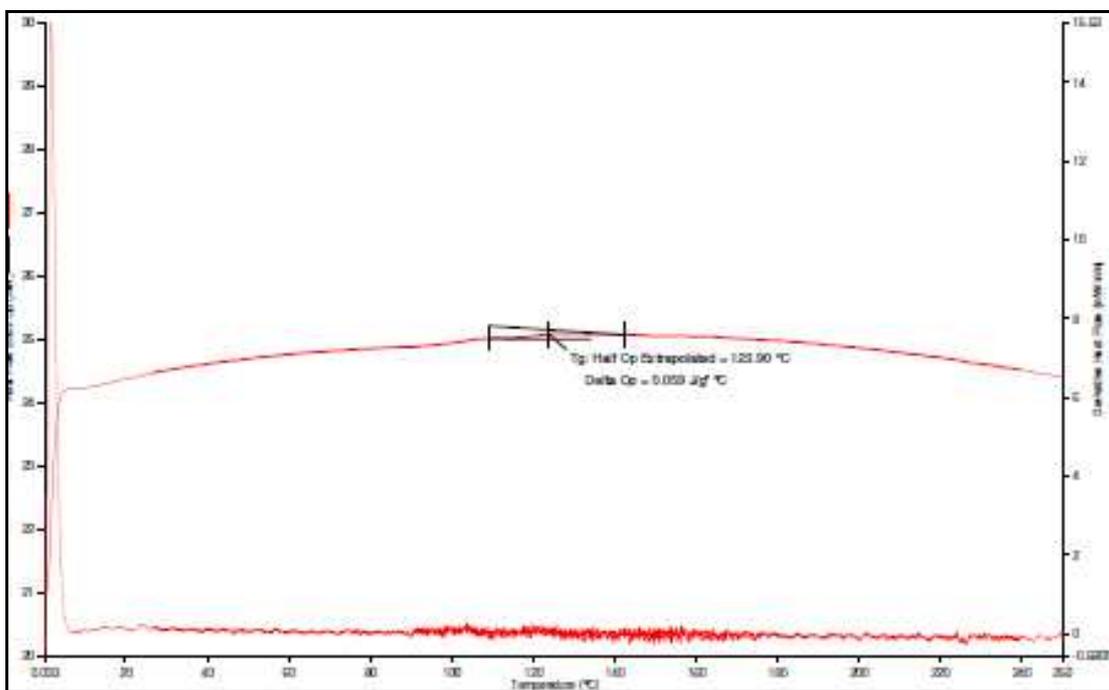


Figura B13: Curva de DSC de PMMA-DVB/PMMA.

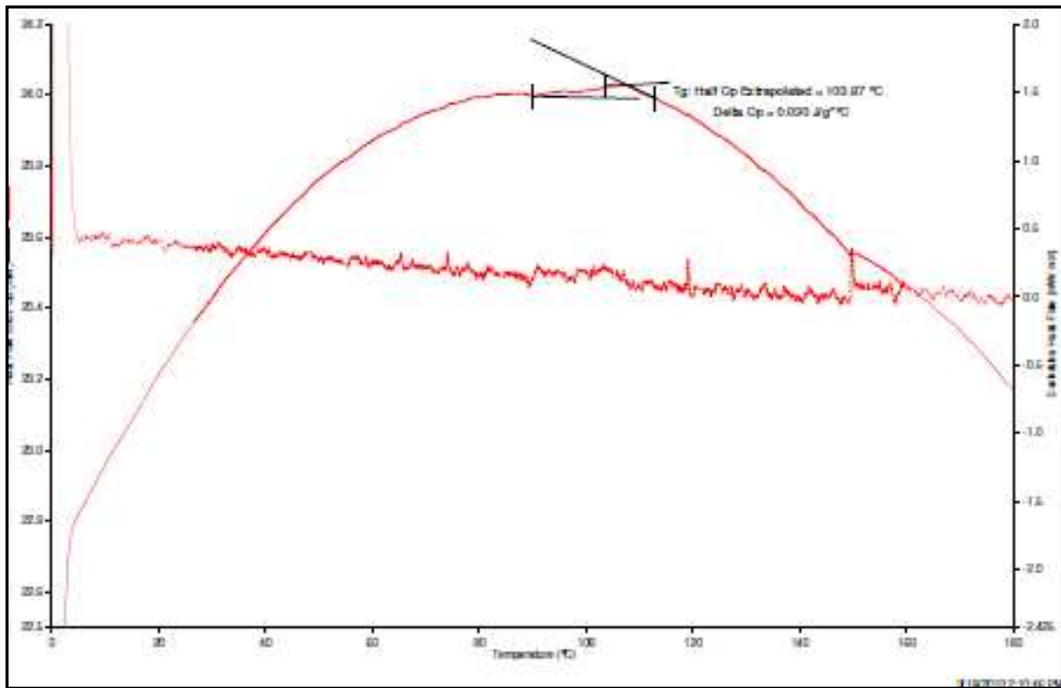


Figura B14: Curva de DSC de PMMA-DVB/PMMA-DVB.

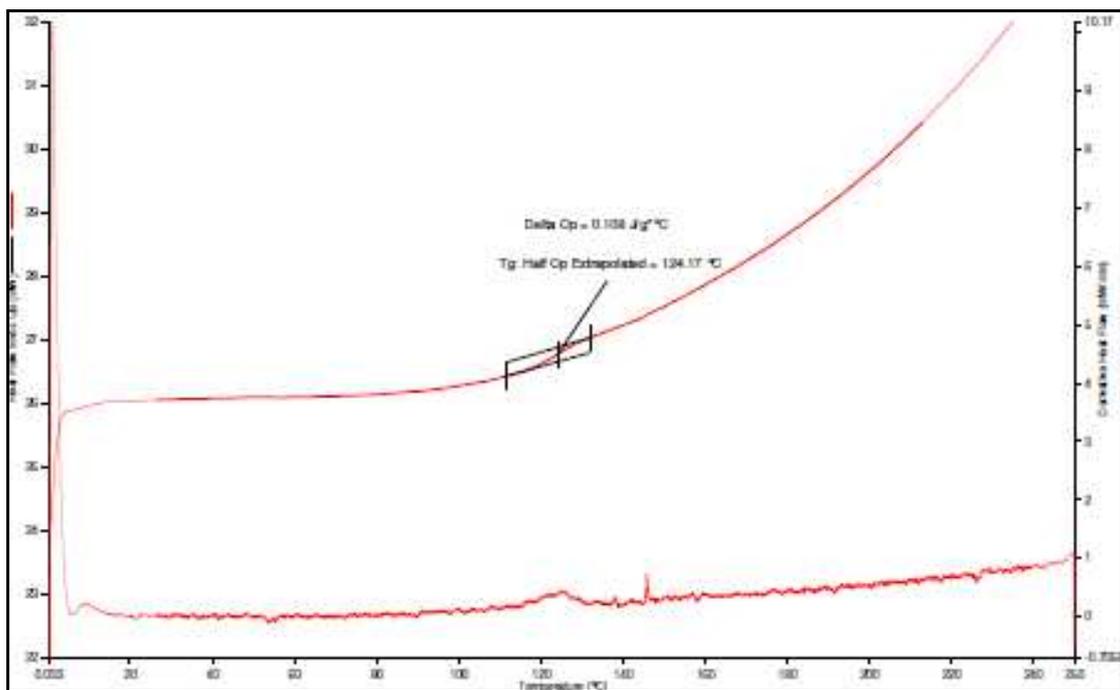


Figura B15: Curva de DSC de PMMA/PMMA-DVB.

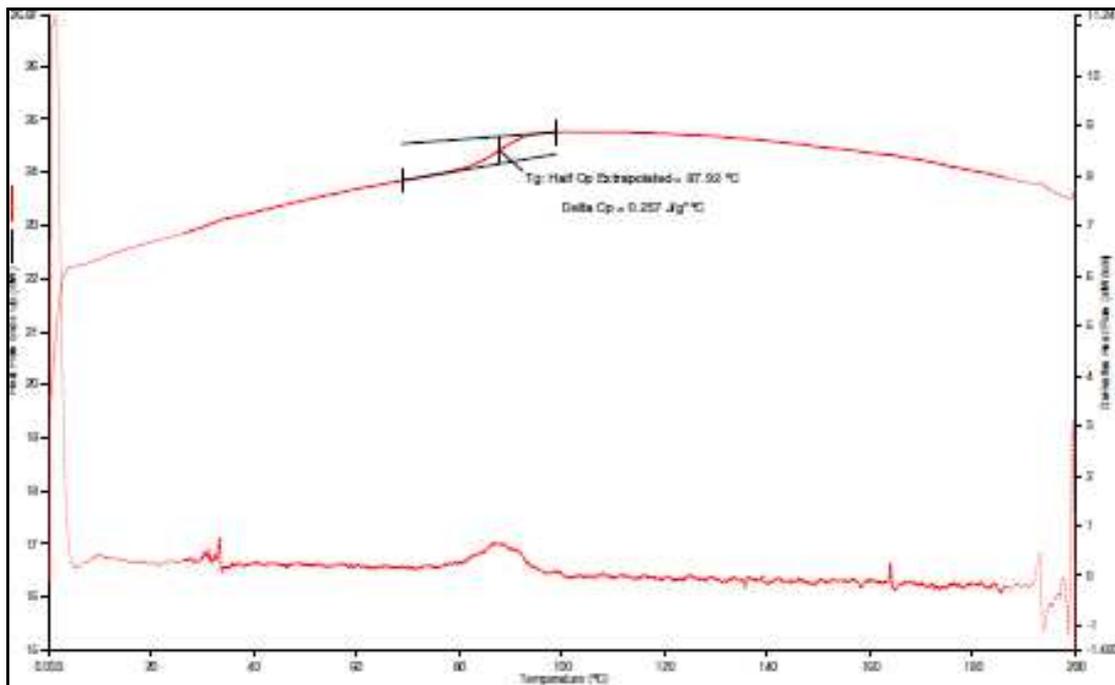


Figura B16: Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 40%.

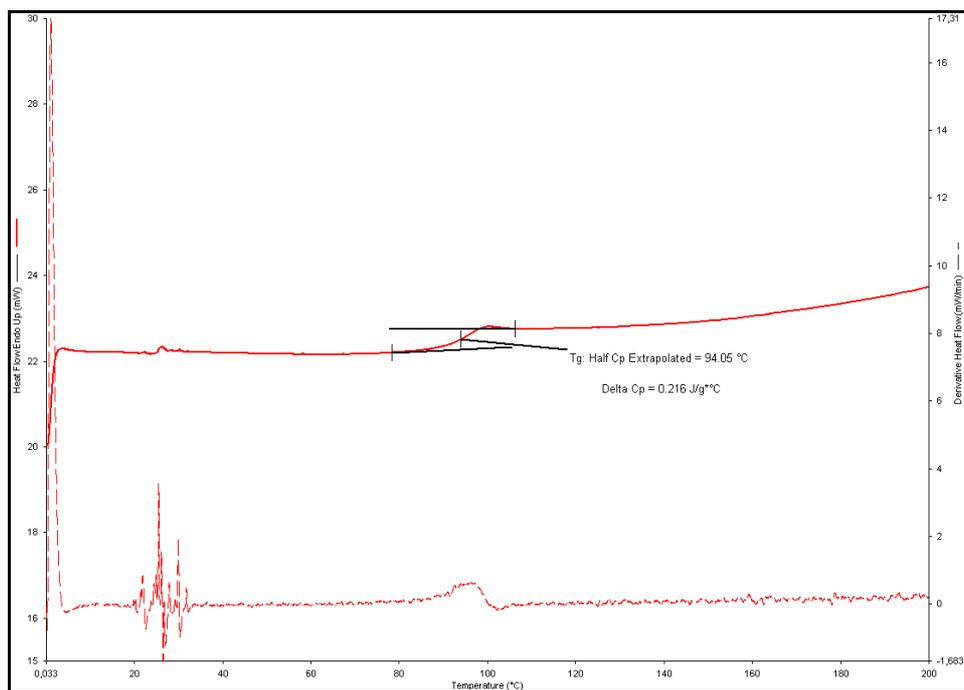


Figura B17: Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 50%.

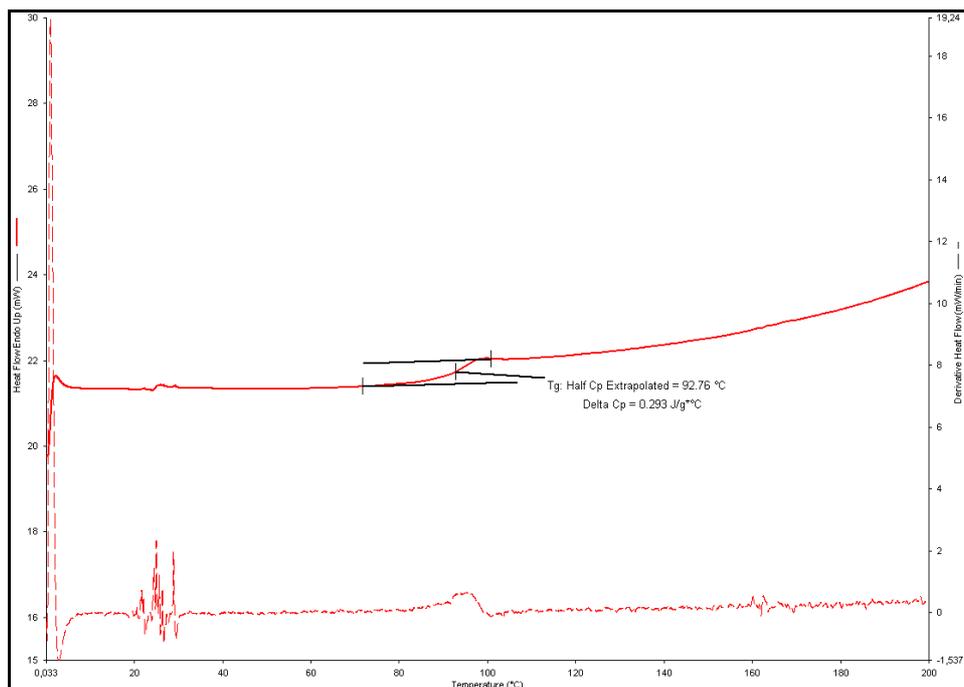


Figura B18: Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 60%.

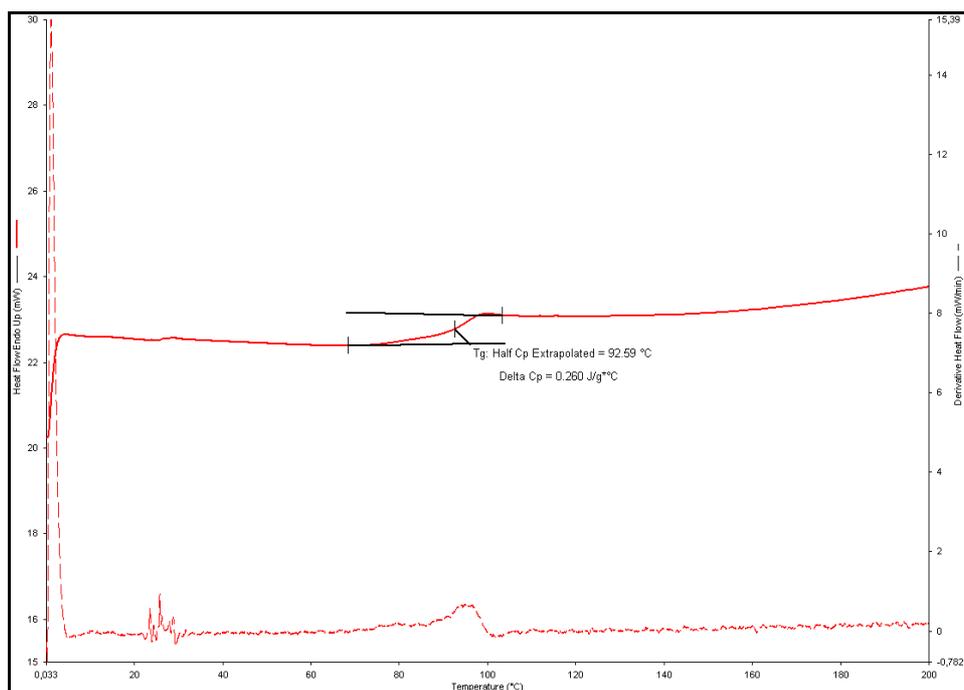


Figura B19: Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 70%.

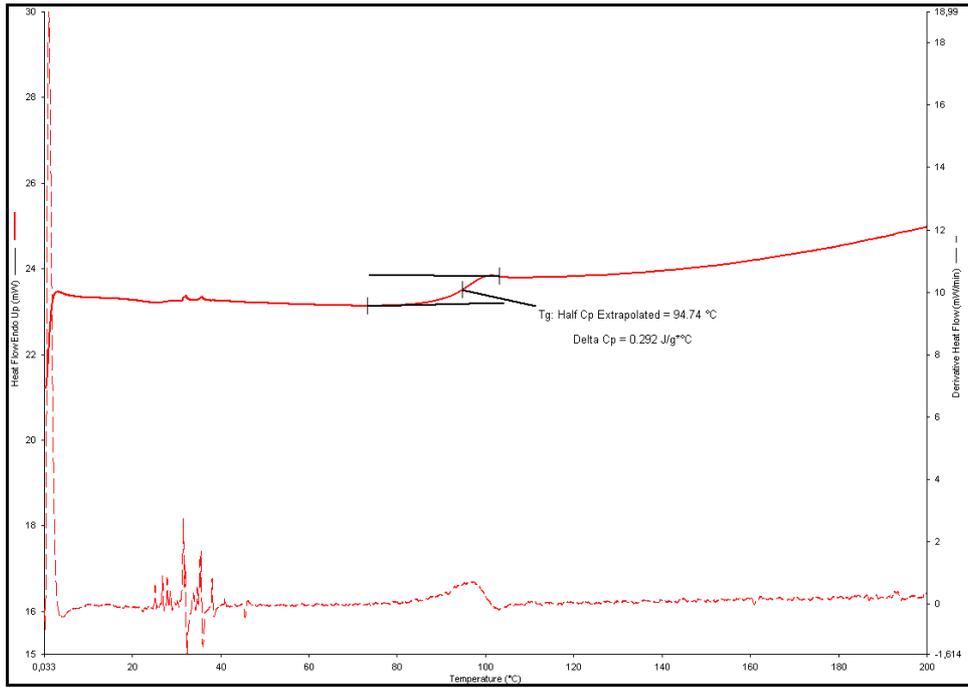


Figura B20: Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 80%.

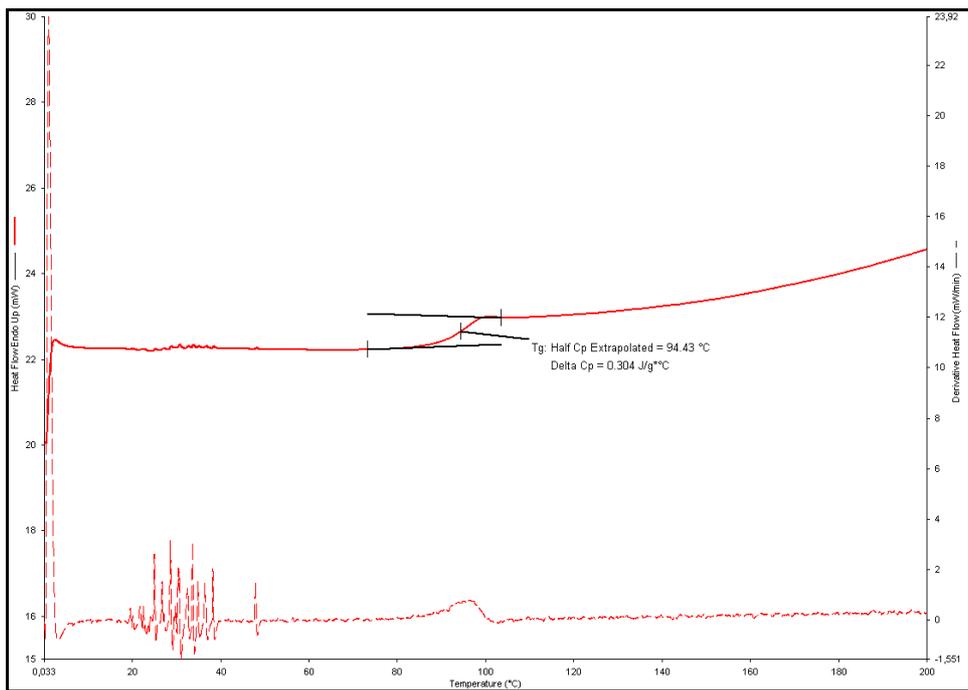


Figura B21: Curva de DSC de PS/PVAc-PMMA 90%.

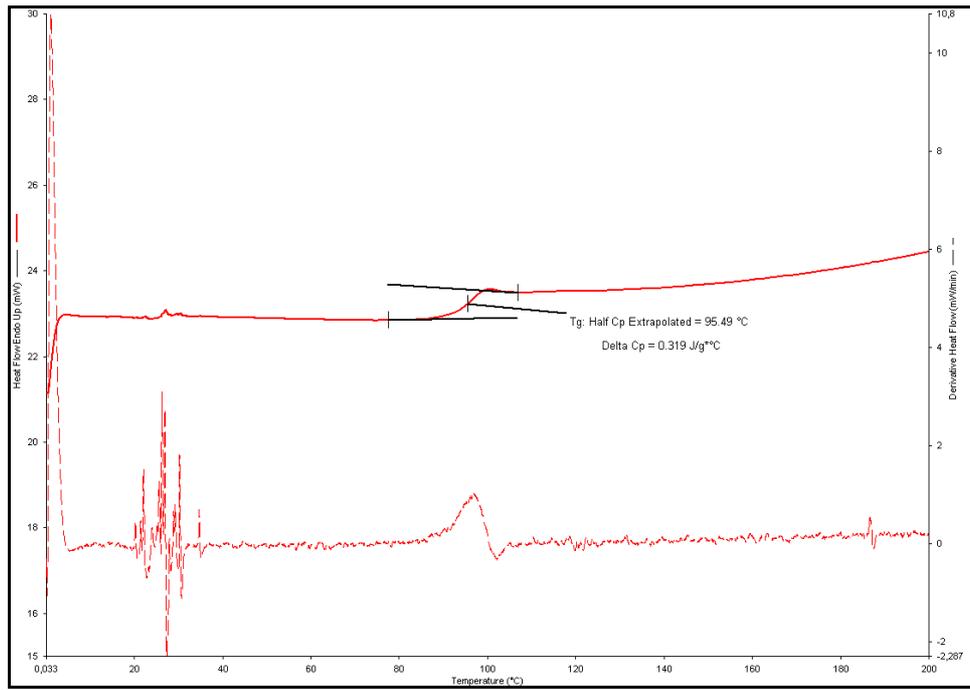


Figura B22: Curva de DSC de R3.

APÊNDICE C

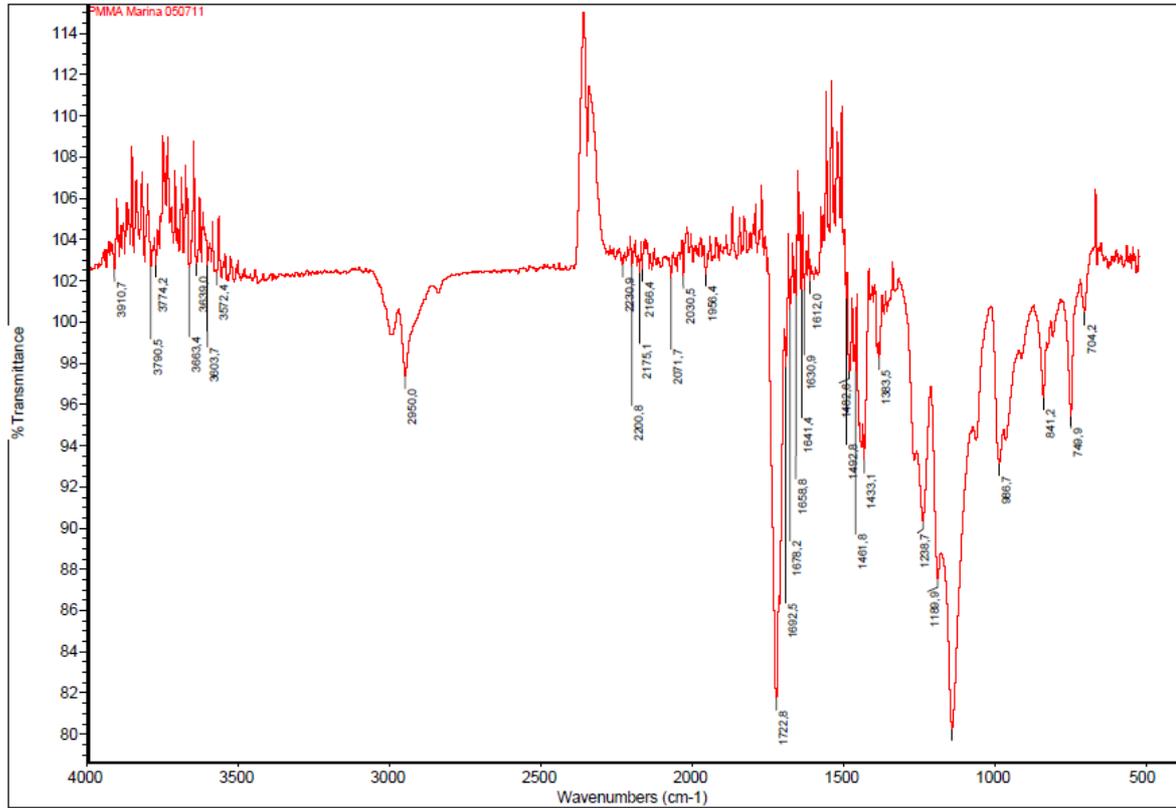


Figura C1: Espectro de FT-IR de PMMA puro.

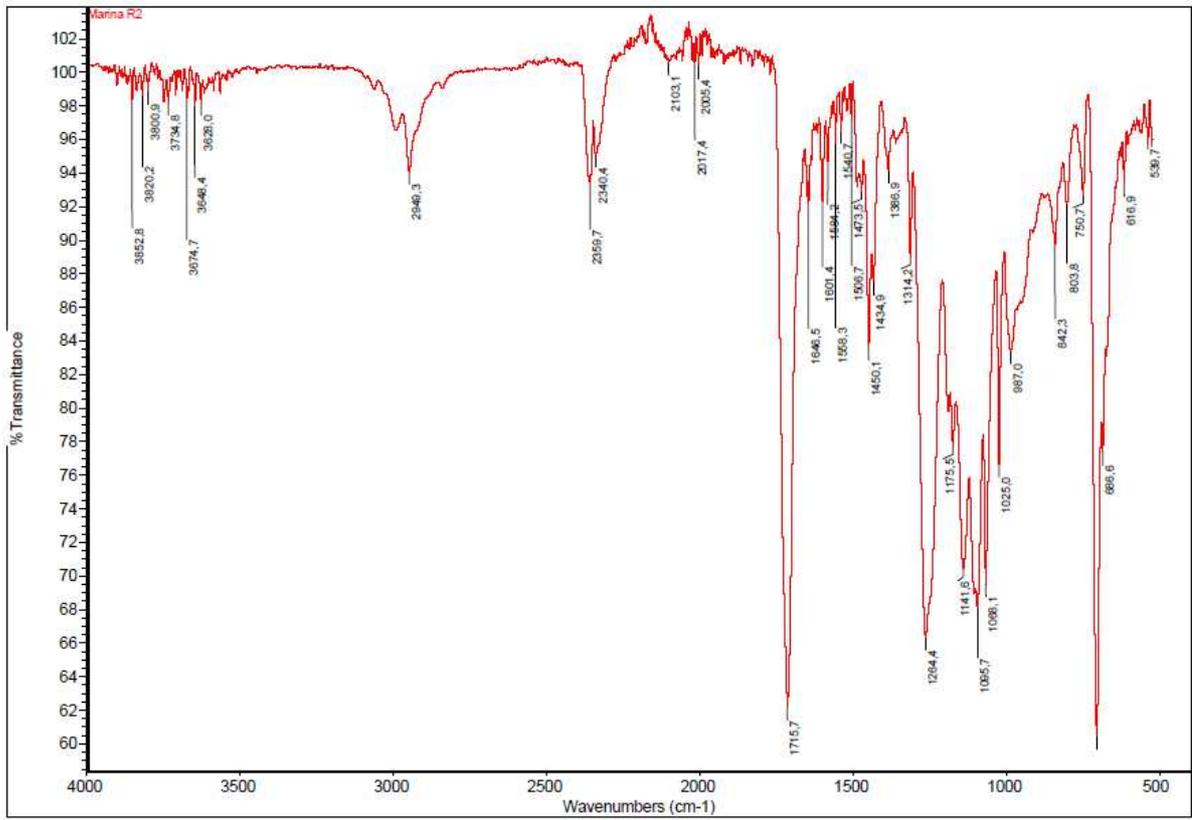


Figura C2: Espectro de FT-IR de PMMA R2.

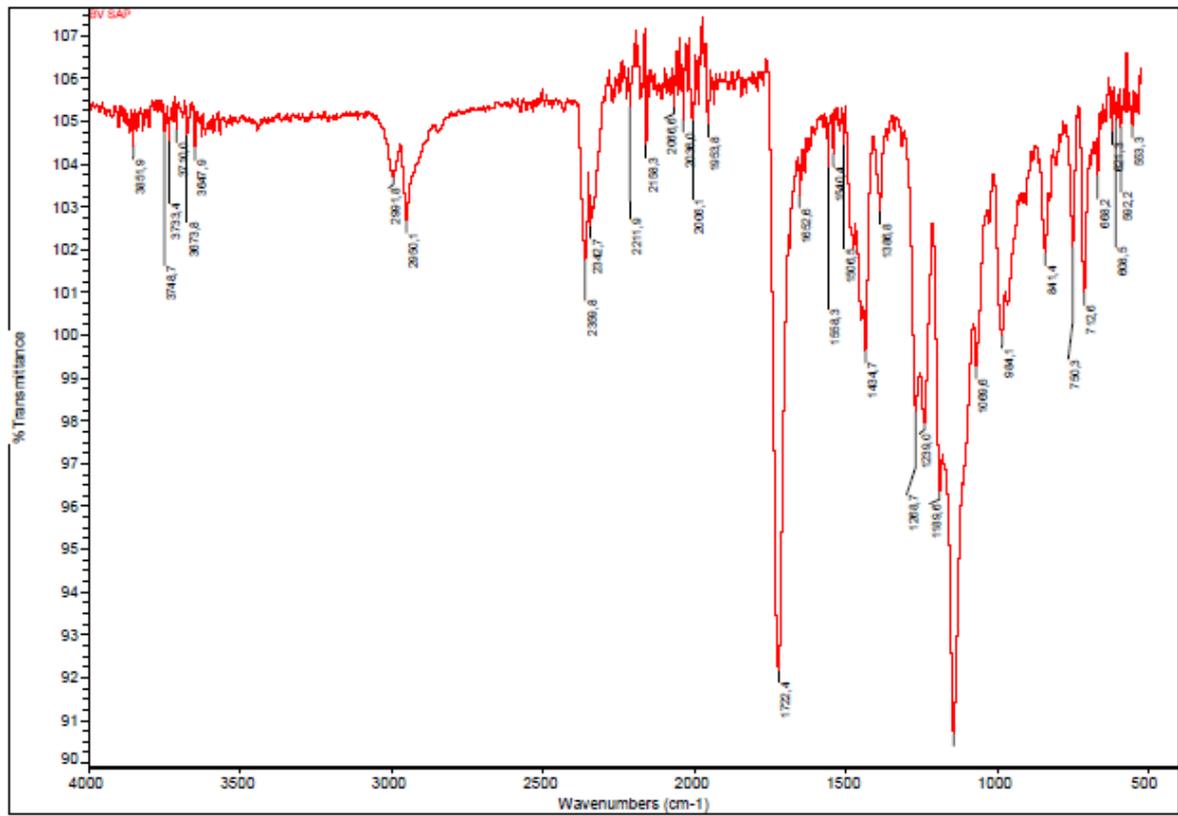


Figura C3: Espectro de FT-IR de PMMA/PMMA-BV SAP.

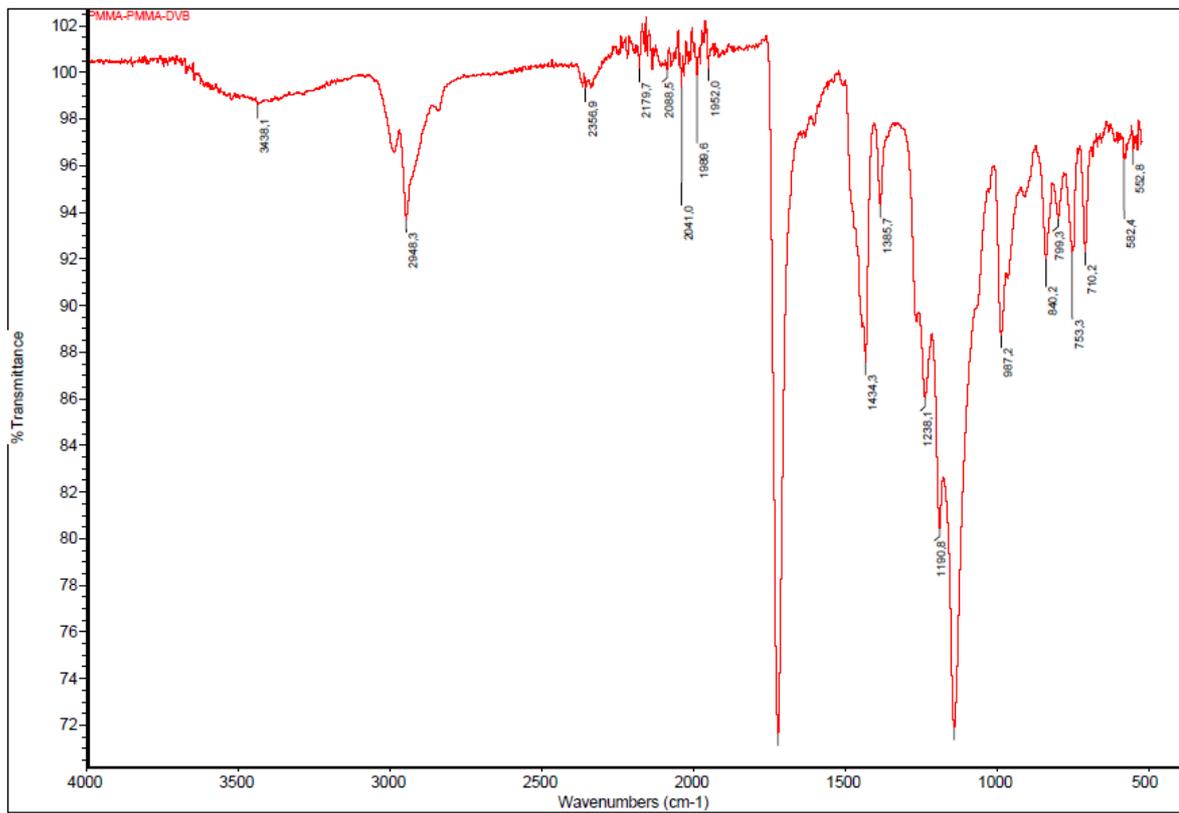


Figura C5: Espectro de FT-IR de PMMA-DVB/PMMA.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIAN, O., WILSON, L., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., “Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric gels) surrounding enzyme molecules. New enzyme derivatives to be used in any reaction media”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19-20, pp. 295-303, 2002.
- AGOSTINELLI, E., BELLI, F., TEMPERA, G., MURA, A., FLORES, G., TONIOLO, L., VAVASORI, A., FABRIS, S., MOMO, F., STEVANATO, R., “Polyketone polymer: a new support for direct enzyme immobilization”, *Journal of Biotechnology*, v. 127, pp. 670-678, 2007.
- ALB, A. M., REED, W. F., “Simultaneous monitoring of polymer and particles characteristics during emulsion polymerization”, *Macromolecules*, v. 41, pp. 2406-2414, 2008.
- AL-DURI, B., YONG, Y. P., “Lipase immobilisation: an equilibrium study of lipases immobilised on hydrophobic/hydrophilic supports”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 4, pp. 207-215, 2000.
- ALMEIDA, R. V., BRANCO, R. V., PEIXOTO, B., LIMA, C. S., ALQUERES, S. M. C., MARTINS, O. B., ANTUNES, O. A. C., FREIRE, D. M. G., “Immobilization of a recombinant thermostable esterase (*Pf2001*) from *Pyrococcus furiosus* on microporous polypropylene: Isotherms, hyperactivation and purification”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 390, pp. 531-537, 2008.
- ARORA, S., GESTHUISEN, R., ENGELL, S., “Model based operation of emulsion polymerization reactors with evaporative cooling: application to vinyl acetate homopolymerization”, *Computers and Chemical Engineering*, v. 31, pp. 552-564, 2007.

- ARUNBABU, D., SANNINGRAHI, A., JANA, T., “Tuning the particle size and charge density of the crosslinked polystyrene particles”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 108, pp. 2718-2725, 2008.
- ATIA, K. S., “Co-immobilization of cyclohexanone monooxygenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase onto polyethylenimine-porous agarose polymeric composite using γ irradiation to use in biotechnological processes”, *Radiation Physics and Chemistry*, v. 73, pp. 91-99, 2005.
- AYHAN, F., AYHAN, H., PISKIN, E., TANYOLAÇ, A., “Optimization of urease immobilization onto non-porous HEMA incorporated poly(EGDMA) microbeads and estimation of kinetics parameters”, *Bioresource Technology*, v. 81, pp. 131-140, 2002.
- BAI, Y-X., LI, Y-F., WANG, M-T., “Study on synthesis of a hydrophilic bead carrier containing epoxy groups and its properties for glucoamylase immobilization”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 540-547, 2006.
- BALTIERE, R. C., INNOCENTINI-MEI, L. H., TAMASHIRO, W. M. S. C., PERES, L., BITTENCOURT, E., “Synthesis of porous microspheres from amino-polymers”, *European Polymer Journal*, v. 38, pp. 57-62, 2002.
- BAYRAMOGLU, G., TUNALI, Y., ARICA, M. Y., “Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor”, *Catalysis Communications*, v. 8, pp. 1094-1101, 2007.
- BESTETI, M. D., “Produção e Caracterização de Partículas Casca-Núcleo Obtidas pela Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão”. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009.
- BEVILAQUA, J. V., “Estudo da Catálise Enzimática em Meio Orgânico para a Produção de Protótipo de Fármaco Antiasmático”. Tese D.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2005.

- BHUSHAN, I., PARSHAD, R., QAZI, G. N., INGAVLE, G., JAMALPURE, T. M., RAJAN, C. R., PONRATHNAM, S., GUPTA, V. K., “Macroporous beads for lipase immobilization: kinetic resolution of a racemic drug intermediate”, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 22, pp. 174-194, 2007.
- BIEGUNSKI, A. T., MICHOTA, A., BUKOWSKA, J., JACKOWSHA, K., “Immobilization of tyrosinase on poly(indole-5-carboxylic acid) evidenced by electrochemical and spectroscopic methods”, *Bioelectrochemistry*, v. 69, pp. 41-48, 2006.
- BLANCO, R. M., TERREROS, P., MUÑOZ, N., SERRA, E., “Ethanol improves lipase immobilization on a hydrophobic support”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 47, pp. 13-20, 2007.
- BORTHAKUR, L. J., DAS, D., DOLUI, S. K., “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, 2010.
- BRANCO, R. V., GUTARRA, M. L. E., FREIRE, D. M. G., ALMEIDA, R. V., “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, 2010.
- BRANDUP, J., IMMERGUT, E., GRULKE, E. A., “Polymer Handbook”, 4 ed, New York, USA, John Wiley & Sons, 1999.
- BRIJMOHAN, S. B., SWIER S., WEISS, R. A., SHAW, M. T., “Synthesis and characterization of cross-linked sulfonated polystyrene nanoparticles”, *Industrial & Engineering Chemistry and Research*, v. 44, pp. 8039-8045, 2005.
- BRINK, L. E. S., TRAMPER, J., LUYBEN, K. Ch. A. M., VAN'T RIET, K., “Biocatalysis in organic media”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 10, pp. 736-743, 1988.

- BULMUS, V., AYHAN, H., PISKIN, E., “Modified PMMA monosize microbeads for glucose oxidase immobilization”, *Chemical Engineering Journal*, v. 65, pp. 71-76, 1997.
- CANEVAROLO, S. V., “Técnicas de caracterização de polímeros”, 1 ed, São Paulo, Brasil, 2004.
- CAI, J., GUO, J., JI, M., YANG, W., WANG, C., FU, S., “Preparation and Characterization of Multiresponsive Polymer Composite Microspheres with Core-Shell Structure”, *Colloid Polymer Science*, v. 285, pp. 1607-1615, 2007.
- CASTILHO, L. R., POLATO, C. M. S., BARUQUE FILHO, E. A., SANT’ANNA JR, G. L., FREIRE, D. M. G., “Economic analysis of lipase production by *Penicillium restrictum* in solid-state and submerged fermentations”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 43, pp. 239-247, 2000.
- CHAIYASAT, A., YAMADA, M., KOBAYASHI, H., SUZUKI, T., OKUBO, M., “Incorporation of Nonionic Emulsifiers Inside Styrene-Methacrylic Acid Copolymer Particles During Emulsion Copolymerization”, *Polymer*, v. 49, pp. 3042-3047, 2008.
- CHANG, S-F., CHANG, S-W., YEN, Y-H., SHIEH, C-J., “Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on celite by RSM”, *Applied Clay Science*, v. 37, pp. 67-73, 2007.
- CHEN, B., MILLER, M. E., GROSS, R. A., “Effects of porous polystyrene resin parameters on *Candida antarctica* lipase B adsorption, distribution, and polyester synthesys activity”, *Langmuir*, v. 23, pp. 6467-6474, 2007a.
- CHEN, B., MILLER, E. M., MILLER, L., MAIKNER, J. J., GROSS, R. A., “Effects of macroporous resin size on *Candida antarctica* lipase B adsorption, fraction of active molecules, and catalytic activity for polyester synthesys”, *Langmuir*, v. 23, pp. 1381-1387, 2007b.

- CHEN, B., HU, J., MILLER, E. M., XIE, W., CAI, M., GROSS, R. A., “*Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis”, *Biomacromolecules*, v. 9, pp. 463-471, 2008.
- CORADIN, T., LIVAGE, J., “Mesoporous alginate/silica biocomposites for enzyme immobilisation”, *Comptes Rendus Chimie*, v. 6, pp. 147-152, 2003.
- CRESPO, J. S., QUEIROZ, N., NASCIMENTO, M. G., SOLDI, V., “The use of lipase on poly(ethylene oxide) for the preparation of alkyl esters”, *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 401-409, 2005.
- CUI, X., ZHONG, S., WANG, H., “Emulsifier-free core-shell polyacrylate latex nanoparticles containing fluorine and silicon in shell”, *Polymer*, v. 48, pp. 7241-7248, 2007.
- CUNHA, A. G., “Purificação e imobilização de lipases microbianas em suportes com diferentes graus de hidrofobicidade”. Dissertação de M.Sc., Instituto de Química,/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2007.
- CUNHA, A. G., LORENTE, G. F.; BEVILAQUA, J. V., DESTAIN, J., PAIVA, L. M. C., FREIRE, D. M. G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., “Immobilization of *Yarrowia lipolytica* lipase a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, p. 49-56, 2008.
- CUNHA, A. G.; LORENTE, G. F.; GUTARRA, M. L. E., BEVILAQUA, J. V., VOLCAN, R., PAIVA, L. M. C., LAFUENTE, R. F., GUISÁN, J. M., FREIRE, D. M. G., “Separation and immobilization of lipase from *Penicillium simplicissimum* by selective adsorption on hydrophobic supports”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 156, p. 563-575, 2009.
- CUNNINGHAM, M. F., “Controlled/living radical polymerization in aqueous dispersed systems”, *Progress in Polymer Science*, v. 33, pp. 365-398, 2008.

- ÇETINUS, S. A., ÖZTOP, H. N., SARAYDIN, D., “Immobilization of catalase onto chitosan and cibacron blue F3G4 attached chitosan beads”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, pp. 447-454, 2007.
- DALLA-VECCHIA, R., SEBRÃO, D., NASCIMENTO, M. G., *et al.*, “Carboximetilcellulose and poly(vinyl alcohol) used as a film support for lipase immobilization”, *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 2677-2682, 2005.
- DING, L., QU, B., “New Supports for Enzyme Immobilization Based on the Copolymers of Poly(vinylene carbonate) and α -(2-aminoethylene amino)- ω -(2-aminoethylene amino)-poly(ethylene oxide)”, *Reactive and Functional Polymers*, v. 49, pp. 67-76, 2001.
- DOTSON, N. A., GALVÁN, R., LAURENCE, R. L., TIRRELL, M., “Polymerization process modeling”, *VCH Publishers*, New York, 1996.
- FERGUSON, C. J., RUSSELL, G. T., GILBERT, R.G., “Synthesis of Latices With Polystyrene Cores and Poly(vinyl acetate) Shells. 1. Use of Polystyrene Seeds”, *Polymer*, v. 43, pp. 6371-6382, 2002.
- FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., ARMISÉN, P., SABUQUILLO, P., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUISÁN, J. M., “Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports”, *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, pp. 185-197, 1998.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., PALOMO, J. M., MATEO, C., BASTIDA, A., COCA, J., HARAMBOURE, T., HERNÁNDEZ-JUSTIZ, O., TERRENI, M., GUISÁN, J. M., “Biocatalyst engineering exerts a dramatic effect on selectivity of hydrolysis catalyzed by immobilization lipases in aqueous medium”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 11, pp. 649-656, 2001.
- FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J. M., CABRERA, Z., GUISÁN, J. M., “Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of

- lipases by interfacial activation on hydrophobic supports”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, pp. 565-569, 2007.
- FIGUEIREDO, K. C. S., SALIM, V. M. M., ALVES, T. L. M., PINTO, J. C., “Lysozyme adsorption onto supports: a comparative study”, *Adsorption*, v. 11, pp. 131-138, 2005.
- FRANÇA, S. C. A., COUTO, H. J.B., “Análise microgranulométrica – Malvern e Sedigraph”, 2007. Acessado em 05 de maio de 2011.
- FREIRE, D. M. G., “Imobilização de amiloglicosidase em quitina – caracterização e testes em reatores contínuos de leito expandido”. Dissertação de M.Sc., Escola de Química/UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil, 1988.
- FREIRE, D. M. G.; CASTILHO, L. R., “Lipases em biocatálise”, In: *Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado*, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência, 2008.
- FREIRE, D. M. G., XAVIER, M. T., SOARES, V. F., MOREIRA, C. C. P., MENDES, M. F., BON, E. P. S., “alfa-Amylase and glucoamylase. Immobilized on chitin and ceramics”, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 13, pp. 25-32, 1987.
- FUENTES, M., MAQUIESE, J. V., PESSELA, B. C. C., ABIAN, O., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., MATEO, C., GUISÁN, J. M., “New cationic exchanger support for reversible immobilization of proteins”, *Biotechnology Progress*, v. 20, pp. 284-288, 2004a.
- FUENTES, M., PESSELA, B. C. C., MAQUIESE, J. V., ORTIZ, C., SEGURA, L. R., PALOMO, J. M., ABIAN, O., TORRES, R., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., “Reversible and strong immobilization of proteins by ionic exchange on supports coated with sulfate-dextran”, *Biotechnology Progress*, v. 20, pp. 1134-1139, 2004b.

- GANCARZ, I., BRYJAK, J., BRYJAK, M., TYLUS W., POZNIAK, G.,
“Poly(phenylene oxide) films modified with allylamine plasma as a support for
invertase immobilization”, *European Polymer Journal*, v. 42, pp. 2430-2440, 2006.
- GEORGIADOU, S., BROOKS, B. W., “Suspension polymerization of methyl
methacrylate using ammonium polymethacrylate as a suspending agent”, *Chemical
Engineering Science*, v. 61, pp. 6892-6901, 2006.
- GHAMGUI, H., MILED, N., KARRA-CHAÂBOUNI, M., GARGOURI, Y.,
“Immobilization studies and biochemical properties of free and immobilized
Rhizopus oryzae lipase onto CaCO₃: a comparative study”, *Biochemical
Engineering Journal*, v. 37, pp. 34-41, 2007.
- GHAZI, I., DE SEGURA, A. G., FERNÁNDEZ-ARROJO, L., ALCALDE, M.,
YATES, M., ROJAS-CERVANTES, M. L., PLOU, F. J., “Immobilisation of
fructosyltransferase from *Aspergillus aculeatus* on epoxy-activated sephabeads EC
for the synthesis of fructo-oligosaccharides”, *Journal of Molecular Catalysis B:
Enzymatic*, v. 35, pp. 19-27, 2005.
- GONÇALVES, O. H., ASUA, J. M., ARAÚJO, P. H. H., MACHADO, R. A. F.,
“Synthesis of PS/PMMA core-shell structured particles by seeded suspension
polymerization”, *Macromolecules*, v. 41, pp. 6960-6964, 2008.
- GONÇALVES, O. H., MACHADO, R. A. F., ARAÚJO, P. H. H., *et al.*, “Secondary
Particle Formation in Seeded Suspension Polymerization”, *Polymer*, v. 50, pp. 375-
381, 2009.
- GU, Q., LIN, Q., HU, C., *et al.*, “Study on Emulsion and Suspension *In Situ*
Polymerization”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 95, pp. 404-412, 2005.
- GUISÁN, J. M., SABUQUILLO, P., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., FRENÁNDEZ-
LORENTE, G., MATEO, C., HALLING, P. J., KENNEDY, D., MIYATA, D., RE,
D., “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, 2001.
- HASHIM, S., BROOKS, B. W., “Drop mixing in suspension polymerization”, *Chemical Engineering Science*, v. 57, pp. 3703-3714, 2002.
- HARKINS, W. D., “A general theory of the reaction loci in emulsion polymerization”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 13 (9), pp. 381-382, 1945a.
- HARKINS, W. D., “A general theory of the reaction loci in emulsion polymerization II”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 13 (10), pp. 47-48, 1945b.
- HARKINS, W. D., “A general theory of the mechanism of emulsion polymerization”, *Journal of American Chemical Society*, v. 69, pp. 1428-1444, 1947.
- HASIRCI, N., AKSOY, S., TUMTURK, H., “Activation of poly(dimer acid-co-alkyl polyamine) particles for covalent immobilization of α -amylase”, *Reactive and Functional Polymers*, v. 66, pp. 1546-1551, 2006.
- HEILMANN, S. M., DRTINA, G. J., HADDAD, L. C., RASMUSSEN, J. K., GADDAM, B. N., LIU, J. J., FITZSIMONS, R. T., FANSLER, D. D., VYVYAN, J. R., YANG, Y. N., BEAUCHAMP, T. J., “Azlactone-reactive polymer support for immobilizing synthetically useful enzymes”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 30, pp. 33-42, 2004.
- IMMANUEL, C. D., CORDEIRO, C. F., SUNDARAM, S. S., MEADOWS, E. S., CROWLEY, T. J., DOYLE, F. J., “Modeling of particle size distribution in emulsion Co-polymerization: comparison with experimental data and parametric sensitivity studies”, *Computers and Chemical Engineering*, v. 26, pp. 1133-1152, 2002.
- IVANOV, A. E., SCHNEIDER, M. P., “Methods for the immobilization of lipases and their use for ester synthesis”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 3, pp. 303-309, 1997.

- JAHANZAD, F., SAJJADI, S., BROOKS, B. W., “Characteristic intervals in suspension polymerisation reactors: An experimental and modelling study”, *Chemical Engineering Science*, v. 60, pp. 5574-5589, 2005.
- JAN, A., RAN, Y., YALKOWSKY, S. H., “Effect of pH-sodium lauryl sulfate combination on solubilization of PG-300995 (an anti-HIV agent): a technical note”, *AAPS PharmSciTech Journal*, v. 5, pp. 1-3, 2004.
- JATURANPINYO, M., HARADA, A., YUAN, X., KATAOKA, K., “Preparation of bionanoreactor based on core-shell structured polyion complex micelles entrapping trypsin in the core cross-linked with glutaraldehyde”, *Bioconjugate Chemistry*, v. 15, pp. 344-348, 2004.
- JONSSON M., NORDIN, O., MALMSTRÖM, E., HAMMER, C., “Suspension polymerization of thermally expandable core/shell particles”, *Polymer*, v. 47, 3315-3324, 2006.
- KAHRAMAN, M. V., BAYRAMOGLU, G., KAYAMAN-APOHAN, N., GÜNGÖR, A., “ α -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment”, *Food Chemistry*, v. 104, pp. 1385-1392, 2007.
- KANG, Y., HE, J., GUO, X., GUO, X., SONG, Z., “Influence of pore diameters on the immobilization of lipase in SBA-15”, *Industry and Engineering Chemical Research*, v. 46, pp. 4474-4479, 2007.
- KATCHALSKI-KATZIR, E., KRAEMER, D. M., “Eupergit[®] C, a carrier for immobilization of enzymes of industrial potential”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 10, pp. 157-176, 2000.
- KHARE, S. K., NAKAJIMA, M., “Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexanoic acid in soybean oil”, *Food Chemistry*, v. 68, pp. 153-157, 2000.

- KIPARISSIDES, C., “Polymerization reactor modeling: a review of recent developments and future directions”, *Chemical Engineering Science*, v. 51, pp. 1637-1659, 1996.
- KIRK, O., BORCHERT, T. V., FUGLSANG, C. C., “Industrial Enzyme Applications”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 345-351, 2002.
- KNEZEVIC, Z., MOJOVIC, L., ADNADJEVIC, B., “Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Z”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 22, pp. 275-280, 1998.
- KOTHA, A., RAMAN, R. C., PONRATHNAM, S., “Beaded reactive polymers, 2. immobilisation of penicillin G acylase on glycidyl methacrylate-divinyl benzene copolymers of differing pore size and its distribution”, *Reactive and Functional Polymers*, v. 28, pp. 235-242, 1996.
- KOTOULAS, C., KIPARISSIDES, C., “A generalized population balance model For the prediction of particle size distribution in suspension polymerization reactors”, *Chemical Engineering Science*, v. 61, pp. 332-346, 2006.
- LANDFESTER, K., ROTHE, R., ANTONIETTI, M., “Convenient synthesis of fluorinated latexes and core-shell structures by miniemulsion polymerization”, *Macromolecules*, v. 35, pp. 1658-1663, 2002.
- LATHOUDER, K. M., VAN BENTHEM, D. T. J., WALLIN, S. A., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., KAPTEIJN, F., MOULIJN, J. A., “Polyethyleneimine (PEI) functionalized ceramic monoliths as enzyme carriers: preparation and performance”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 50, pp. 20-27, 2008.
- LENZI, M. K., “Modelagem da polimerização simultânea de estireno em suspensão e emulsão”. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.

- LENZI, M. K., SILVA, F. M., LIMA, E.L., PINTO, J. C., “Semibatch styrene suspension polymerization processes”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 89, pp. 3021-3038, 2003.
- LENZI, M. K., CUNNINGHAM, M. F., LIMA, E. L., PINTO, J. C., “Modeling semibatch styrene suspension polymerization processes”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 96, pp. 1950-1967, 2005.
- LENZI, M. K., LIMA, E. L., PINTO, J. C., “Detecting core-shell structure formation using near infrared spectroscopy”, *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 14, pp. 1-9, 2006.
- LI, L., HITCHCOCK, A. P., ROBAR, N., CORNELIUS, R., BRASH, J. L., SCHOLL, A., DORAN, A., “X-ray microscopy studies of protein adsorption on a phase-segregated polystyrene/polymethyl methacrylate surface. 1. Concentration and exposure-time dependence for albumin adsorption”, *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 110, pp. 16763-16773, 2006.
- LI, S., HU, J., LIU, B., “Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization”, *BioSystems*, v. 77, pp. 25-32, 2004.
- LIN, W., BIEGLER, L. T., JACOBSON, A. M., “Modeling and optimization of a seeded suspension polymerization process”, *Chemical Engineering Science*, v. 65, pp. 4350-4362, 2010.
- LOVELL, P. A., EL-AASSER, M. S., “Emulsion Polymerization and Emulsion Polymers”, 1 ed., New York, USA, John Wiley & Sons, 1997.
- MACHADO, F. M., “Modelagem e controle da composição em sistema de polimerização em suspensão”, Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2002.

- MACHADO, F., LIMA, E. L., PINTO, J. C., “Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, pp. 1-15, 2007.
- MACHADO, R. A. F., PINTO, J. C., ARAÚJO, P. H. H., BOLZAN, A., “Mathematical modeling of polystyrene particle size distribution produced by suspension polymerization”, *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v. 17, pp. 395-405, 2000.
- MATEO, C., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., ABIAN, O., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., “Multifunctional epoxy supports: a new tool to improve the covalent immobilization of proteins. The Promotion of physical adsorption of proteins before their covalent linkage”, *Biomacromolecules*, v. 1, pp. 739-745, 2000.
- MATEO, C., TORRES, R., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., ORTIZ, C., FUENTES, M., HIDALGO, A., LÓPEZ-GALLEGO, F., ABIAN, O., PALOMO, J. M., BETANCOR, L., PESSELA, B. C. C., GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., “Epoxy-amino groups: a new tool for improved immobilization of proteins by the epoxy method”, *Biomacromolecules*, v. 4, pp. 772-777, 2003.
- MATEO, C., PALOMO, J. M., FUENTES, M., BETANCOR, L., GRAZU, V., LÓPEZ-GALLEGO, F., PESSELA, B. C. C., HIDALGO, A., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., “Glyoxyl agarose: a fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 274-280, 2006.
- MATSUMOTO, M., OHASHI, K., “Effect of immobilization on thermostability of lipase from *Candida rugosa*”, *Biochemical Engineering Journal*, v. 14, pp. 75-77, 2003.
- MELO, C. K., “Reciclagem de materiais poliméricos por incorporação *in situ* na polimerização em suspensão de estireno”, Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2009.

- MOJOVIC, L., KNEZEVIC, Z., POPADIC, R., JOVANOVIC, S., "Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support", *Applied Microbiol Biotechnology*, v. 50, pp. 676-681, 1998.
- MOSBACH, K., "Immobilised enzymes", *FEBS Letters*, v. 62, pp. 80-95, 1976.
- MURRAY, M., ROONEY, D., VAN NEIKERK, M., MONTENEGRO, A., WEATHERLEY, L. R., "Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis", *Process Biochemistry*, v. 32, pp. 479-486, 1997.
- NAMEN, F., GALAN JR, J., OLIVEIRA, J. F., CABREIRA, R. D., FILHO, F. C. S., SOUZA, A B., DEUS, G., "Surface properties of dental polymers: measurements of contact angles, roughness and fluoride release", *Materials Research*, v. 11, pp. 239-243, 2008.
- NI, X., ZHANG, Y., MUSTAFA, I., "An investigation of droplet size and size distribution in methylmethacrylate suspensions in a batch oscillatory-baffled reactor", *Chemical Engineering Science*, v. 53, pp. 2903-2919, 1998.
- NOMURA, M., TOBITA, H., SUZUKI, K., "Emulsion polymerization: kinetics and mechanical aspects". In: *Advances in polymer science*, v. 175, pp. 1-128, Berlin: Springer Press, 2005.
- ODIAN, G., "Principles of polymerization", New Jersey, USA, John Wiley & Sons, 2004.
- OKAMOTO, J., KIMURA, H., TSUCHIDA, A., OKUBO, T., ITO, K., "Colloidal crystals of core-shell type spheres with poly(styrene) core and poly(ethylene oxide) shell", *Colloids Surfaces*, v. 56, pp. 231-235, 2007.
- OKUBO, M., TAKEKOH, R., IZUMI, J., YAMASHITA, T., "Morphology of micron-sized monodispersed poly(butyl methacrylate)/polystyrene composite particles produced by seeded dispersion polymerization", *Colloid Polymer Science*, v. 277, pp. 972-978, 1999.

- OLIVEIRA, D., FEHRMANN, A. C., DARIVA, C., BEVILAQUA, J. V., DESTAIN, J., CUNHA, A. G., OLIVEIRA, J. V., FREIRE, D. M. G., "Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 39, p. 117-123, 2006.
- PALOMO, J. M., MUÑOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., "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, 2002a.
- PALOMO, J. M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., ORTIZ, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., "Modulation of the enantioselectivity of lipases via controlled immobilization and medium engineering: hydrolytic resolution of mandelic acid esters", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 31, pp. 775-783, 2002b.
- PALOMO, J. M., SEGURA, R. L., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PERNAS, M., RUA, M. L., GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., "Purification, Immobilization, and Stabilization of a Lipase From *Bacillus thermocatenuatus* by Interfacial Adsorption on Hydrophobic Supports", *Biotechnology Progress*, v. 20, pp. 630-635, 2004.
- PANZAVOLTA, F., SORO, S., D'AMATO, PALOCCI, C., CERNIA, E., RUSSO, M. V., "Acetylenic polymers as new immobilization matrices for lipolytic enzymes", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 32, pp. 67-76, 2005.
- PEDRAZA, E. P., SOUCEK, M. D., "Effect of functional monomer on the stability and film properties of thermosetting core-shell latexes", *Polymer*, v. 46, pp. 11174-11185, 2005.
- PEIXOTO, L. S., SILVA, F. M., NIEMEYER, M. A. L., ESPINOSA, G., MELO, P. A., NELE, M., PINTO, J. C., "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, 2006.
- PEIXOTO, L. S., “Produção de partículas esféricas de PVA/PVAc com morfologia casca-núcleo para uso em embolização vascular”. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007.
- PENG, S-J., SONG, L-Y, WANG, Y-H., JI, L., XU, M-R., ZHANG, R-G., “The suspension-emulsion combined polymerization of fluorinated acrylic monomer and the fluorinated latex film surface properties”, *Colloid Polymer Science*, v. 289, pp. 149-157, 2011.
- PINTO, J. C., ALVES, T. L. M., LIMA, E. L., SALIM, V. M. M., FIGUEIREDO, K. C. S., LENZI, M. K., “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*, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil, 2004a.
- PINTO, J.C., LOPEZ, G.E., NIEMEYER, M.A.L., SILVA, F.M., MELO, P.A., NELE, M., “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 PI0404994-2*, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil, 2004b.
- PINTO, J.C., LOPEZ, G.E., NIEMEYER, M.A.L., SILVA, F.M., NELE, M., MELO, P.A., “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”, *Pedido de patente internacional PCT/WO2006/050591 A2*, 2006.
- PLIEVA, F. M., KOCHETKOV, K. A., SINGH, I., “Immobilization of hog pancreas lipase in macroporous poly(vinyl alcohol)-ciogel carrier for the biocatalysis in water-poor media”, *Biotechnology Letters*, v. 22, pp. 551-554, 2000.

- POLLACO, G., SEMINO, D., PALLA, M., "Temperature profiles in batch methyl methacrylate polymerization in gelled suspension", *Polymer Engineering and Science*, v.36, pp. 2088-2100, 1996.
- PRABOWO, H., TUMIRAN, BERAHIM, H., "Hydrophobic measurement of RTV silane epoxy resin after exposed in tropical climate", *International Conference on Electrical Engineering and Informatics*, Bandung, Indonésia, 17-19 Junho, 2007.
- PUSCH, J., VAN HERK, A. M., "Emulsion polymerization of transparent core-shell latices with a polydivinylbenzene styrene and vinyl acetate", *Macromolecules*, v. 38, pp. 6909-6914, 2005.
- RAMIREZ, J. C., HERRERA-ORDONEZ, J., "Kinetic aspects of styrene minisuspension polymerization using a mixture PVA-SDS as stabilizer: effect of the time addition of SDS", *European Polymer Journal*, v. 43, pp. 3819-3825, 2007.
- SABBANI, S., HEDENSTRÖM, E., NORDIN, O., "The enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material Accurel", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 42, pp. 1-9, 2006.
- SAJJADI, S., "Nanoparticle formation by monomer-starved semibatch emulsion polymerization", *Langmuir*, v. 23, pp. 1018-1024, 2007.
- SALIS, A., SANJUST, E., SOLINAS, V., MONDUZZI, M., "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, 2003.
- SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M., SOLINAS, V., "Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 54, pp. 19-26, 2008.
- SANCHÉZ-SILVA, L., RODRÍGUEZ, J. F., ROMERO, A., BORREGUERO, A. M., CARMONA, M., SANCHÉZ, P., "Microencapsulation of PCMs with a styrene-

- methyl metacrylate copolymer shell by suspension like polymerization”, *Chemical Engineering Journal*, v. 157, pp. 216-222, 2010
- SANTOS, G. G. B., ANTONELLO, R. T., MCKENNA, T. F., SANTOS, A. F., FORTUNY, M., “Population balance equations for particles size distributions In semibatch emulsion polymerization”, *Latin American Applied Research*, v. 36, pp. 269-275, 2006.
- SANTOS, J. G. F. JR., “Otimização do processo de obtenção do cimento ósseo à base de PMMA”. Dissertação de M.Sc., COPPE/UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil, 2007.
- SARDA, L., DESNUELE, P., “Action de la lipase pancréatique sur les esters em émulsion“, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 58, pp. 513-521, 1958.
- SCHORK, F. J., POEHLEIN, G. W., WANG, S., REIMERS, J., RODRIGUES, J., SAMER, C., “Miniemulsion polymerization”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 153, pp. 39-45, 1999.
- SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J., “Spectrometric identification of organic compound”, 7^o ed., New Jersey, John Wiley & Sons, Inc., 2005.
- SIGMA ALDRICH. Catálogo on-line. Disponível em; <http://www.sigmaaldrich.com/brazil.html>, acessado em 15 de junho de 2011.
- SMITH, W. V., EWART, R. H., “Kinetics of emulsion polymerization”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 16 (6), pp. 592-599, 1948.
- SOARES, M., PINTO, J. C., “PSDA 1.0 – Particle size distribution analyser”, *Patente n° 00077765*, Instituto Nacional de Propriedade Industrial, Rio de Janeiro, Brasil, 2006.
- SRISOPA, A., ALI, A. M. I., MAYES, A. G., “Understanding and preventing the formation of deformed polymer particles during synthesis by a seeded

- polymerization method”, *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 49, pp. 2070-2080, 2011.
- SROUR, M. H., GOMES, V. G., ROMAGNOLI, J. A., “Online inferential attribute estimation for optimal operation of emulsion terpolymerization: application to styrene/MMA/MA”, *Chemical Engineering Science*, v. 62, pp. 4420-4438, 2007.
- SUZUKI, K., NOMURA, M., HARADA, M., “Kinetics of microemulsion polymerization of styrene”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 153, pp. 23-30, 1999.
- TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S., “Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno”, *Química Nova*, v. 24, pp. 808-818, 2001.
- TISCHER, W., KASCHE, V., “Immobilized enzymes: crystals or carriers”, *Trends in Biotechnology*, v. 17, pp. 326-335, 1999.
- TORRES, P., RAJASEKAR, V. W., ZAMBRE, S., ASHAR, T., YATES, M., ROJAS-CERVANTES, M. L., CALERO-RUEDA, O., BARBA, V., MARTÍNEZ, M. J., BALLESTEROS, A., PLOU, F. J., “Characterization and application of a sterol esterase immobilized on polyacrylate epoxy-activated carriers (Dillbeads™)”, *Catalysis Communications*, v. 9, pp. 539-545, 2008.
- UCHIDA, T., SERIZAWA, T., ISE, H., AKAIKE, T., AKASHI, M., “Graft copolymer having hydrophobic backbone and hydrophilic branches. 33. Interaction of hepatocytes and polystyrene nanospheres having lactose-immobilized hydrophilic polymers on their surfaces”, *Biomacromolecules*, v. 2, pp. 1343-1346, 2001.
- VAN BEILEN, J. B., LI, Z., “Enzyme technology: an overview”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 338-344, 2002.
- VANDERHOFF, J. W., “Recent advances in the preparation of latexes”, *Chemical Engineering Science*, v. 48, pp. 203-217, 1993.

- VELEV, O. D., FURUSAWA, K., NAGAYAMA, K., “Assembly of latex particles using emulsion droplets as templates. 2. Ball-like and composite aggregates”, *Langmuir*, v. 12, pp. 2385-2391, 1996.
- VILLENEUVE, P., MUDERHWA, J. M., GRAILLE, J., HAAS, M. J., “Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 9, pp. 113-148, 2000.
- VIVALDO-LIMA, E., WOOD, P. E., HAMIELEC, A. E., “An update review on suspension polymerization”, *Industrial & Engineering Chemistry Research*, v. 36, pp. 939-965, 1997.
- XI, F., WU, J., JIA, Z., LIN, X., “Preparation and characterization of trypsin immobilized on silica gel supported macroporous chitosan bead”, *Process Biochemistry*, v. 40, pp. 2833-2840, 2005.
- XU, S., PENG, B., HAN, X., “Hydrazide-functionalized hollow porous poly(2-hydroxyethyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) spheres for immobilization of enzyme”, *European Polymer Journal*, v. 42, pp. 2801-2806, 2006.
- ZHENQIAN, Z., YONGZHONG, B., ZHIMING H., ZHIXUE, W., “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, 2009.
- WANG, X., SUDOL, E. D., EL-AASSER, M. S., “Emulsion polymerization of styrene using the homopolymer of a reactive surfactant”, *Langmuir*, v. 17, pp. 6865-6870, 2001.
- WU, J., LUAN, M., ZHAO, J., “Trypsin immobilization by direct adsorption on metal ion chelated macroporous chitosan-silica gel beads”, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 39, pp. 185-191, 2006.

YANG, G., TIAN-WEI, T., KAI-LI, N., FANG, W., “Immobilization of lipase on macroporous resin and its application in synthesis of biodiesel in low aqueous media”, *Chinese Journal of Biotechnology*, v. 22, pp. 114-118, 2006.

YUAN, H. G., KALFAS, G., RAY, W. H., “Suspension polymerization”, *Journal of Macromolecular Science – Reviews in Macromolecular Chemistry and Physics*, C31(02-03), pp. 215-299, 1991.