



## DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES ENZIMÁTICOS POR POLIMERIZAÇÃO SIMULTÂNEA EM SUSPENSÃO E EMULSÃO

Martina Costa Cerqueira Pinto

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.

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

Rio de Janeiro  
Setembro de 2017

DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES ENZIMÁTICOS POR POLIMERIZAÇÃO  
SIMULTÂNEA EM SUSPENSÃO E EMULSÃO

Martina Costa Cerqueira Pinto

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.



---

Profa. Evelin Andrade Manoel, D.Sc.



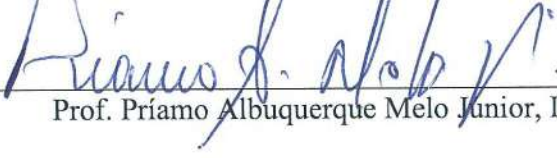
---

Prof. Luis Cláudio Mendes, D.Sc.



---

Paulo Luiz de Andrade Coutinho, D.Sc.



---

Prof. Príamo Albuquerque Melo Junior, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

SETEMBRO DE 2017

Pinto, Martina Costa Cerqueira

Desenvolvimento de Suportes Enzimáticos por Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão/  
Martina Costa Cerqueira Pinto. – Rio de Janeiro: UFRJ/COPPE, 2017.

XXIV, 261 p.: il.; 29,7 cm.

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Tese (doutorado) – UFRJ/ COPPE/ Programa de Engenharia Química, 2017.

Referências Bibliográficas: p. 230-253.

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

*“Ondas me jogam na pedreira  
Ondas me impedem de ir ao chão  
Sigo na vida igual poeira  
Vou cavalgando o turbilhão”  
(José Carlos Jr.)*

## AGRADECIMENTOS

A meus pais, Márcia e José Carlos, por todo apoio, força, incentivo, colo. Muito obrigada por vocês acreditarem nos meus sonhos tanto quanto eu. Amo vocês.

A meu esposo, Frederico, por toda cumplicidade, parceria, companheirismo, paciência, sugestões, apoio, por caminhar sempre de mãos dadas a meu lado. Amo você.

A meus irmãos, Monzico e Ju, pelo incentivo e pela leveza que vocês sempre trazem às muitas horas de dedicação. Amor gigantesco.

A minha família, por todo apoio e toda a força. Principalmente a meus avós e aos cafés quentinhos com bolinho de fubá recheado de carinho! Amo vocês.

A meus amigos, pelo incentivo, carinho, apoio, alegria e paciência.

A meu orientador José Carlos, pela confiança, pelo apoio, por ter compartilhado toda sua experiência e carinho.

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

A meu orientador Remzi Becer, pela confiança, pelos ensinamentos, por ter aberto as portas do seu laboratório para o desenvolvimento de um novo tema.

A meus amigos do LMSCP: Debbie, Larissa, Anderson, Carlos, Jorge, Ricardo, Rafael, Thamiris, Maíra, Luciana, Déboraz, Nathalie, Rayany, Amanda, Simoni, pelos muitos momentos de risadas e descontração que fizeram das idas ao LMSCP sempre um momento de extremo prazer e alegria.

Aos amigos do LABIM: Jack 1, Joab e Eliane por toda ajuda e amizade. Um agradecimento especial a Evelin pela ajuda e, principalmente, pela amizade e pelo carinho.

Aos “fellows” da Queen Mary University of London: Jacky, Yamin, Vali, Manuel, Resat, por toda a ajuda.

Aos amigos além do doutorado, principalmente a Anderson, Luiz, Thainá, Debbie, pela grande amizade.

Aos professores e funcionários do PEQ/COPPE por toda ajuda e sugestões.

À FAPERJ pelo auxílio financeiro. Ao CNPq por financiar o período de doutorado sanduíche de um ano na *Queen Mary University of London*.

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

## DESENVOLVIMENTO DE SUPORTES ENZIMÁTICOS POR POLIMERIZAÇÃO SIMULTÂNEA EM SUSPENSÃO E EMULSÃO

Martina Costa Cerqueira Pinto

Setembro/2017

Orientadores: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Programa: Engenharia Química

O presente trabalho visou à síntese de suportes poliméricos por meio da técnica de polimerização em suspensão-emulsão simultâneas objetivando a produção de biocatalisadores enzimáticos. Inicialmente, foram estudadas diferentes estratégias de reação com o objetivo de aumentar a área específica e porosidade das partículas produzidas. Assim, por meio da redução da duração da etapa de suspensão, foram produzidas novas partículas com morfologia casca-núcleo de P(S-co-DVB) com área específica de até 50 m<sup>2</sup>/g. A estabilidade mecânica das partículas produzidas também foi analisada, sendo observado que o emprego de DVB como comonômero provocava um aumento na resistência mecânica dos materiais poliméricos. Em uma etapa seguinte, tais partículas foram empregadas como suporte para a síntese de biocatalisadores, utilizando a enzima comercial lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) como enzima de estudo. As atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores, assim como os parâmetros de imobilização, foram avaliados. Foram produzidos, então, biocatalisadores com elevada atividade de esterificação (aproximadamente 3500 U/g). Um estudo de escalonamento do processo de polimerização também foi realizado, sendo sintetizadas partículas com diferentes composições, capazes de interagir de maneiras distintas com a enzima estudada. Finalmente, estratégias de funcionalização das nanopartículas formadoras da casca polimérica foram conduzidas. Assim, o presente trabalho permitiu o desenvolvimento de diferentes suportes poliméricos com potencial para imobilização de enzimas distintas e com promissora aplicação em setores industriais diversos.

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

DEVELOPMENT OF ENZYMATIC SUPPORTS THROUGH COMBINED  
SUSPENSION AND EMULSION POLYMERIZATION

Martina Costa Cerqueira Pinto

September/2017

Advisors: José Carlos Costa da Silva Pinto

Denise Maria Guimarães Freire

Department: Chemical Engineering

The present work focused on the synthesis of polymer supports through simultaneous suspension-emulsion polymerizations, aiming at producing enzymatic biocatalysts. Initially, different reaction strategies were adopted in order to increase the specific area and porosity of the produced particles. Thus, it was observed that, by reducing the duration of the suspension step, core-shell particles of P(S-co-DVB) exhibiting high specific area (up to 50 m<sup>2</sup>/g) could be produced. The mechanical stability of the produced particles was also analyzed and it was noticed that the use of DVB as comonomer resulted in the increase of the mechanical resistance of the polymeric materials. In the following step, such particles were employed as supports for immobilization of the commercial lipase B of *Candida antarctica* (CAL-B) for synthesis of biocatalysts. The hydrolytic and esterification activities of the biocatalysts, as well as the immobilization parameters, were evaluated. Then, biocatalysts exhibiting high esterification activity were produced (approximately 3500 U/g). The scale-up of the polymerization process was also carried out and core-shell particles with different compositions, capable of interacting through different manners with the studied enzyme, were synthesized. Finally, the functionalization step of the nanoparticles that cover the polymeric cores were conducted. Thus, the present work enabled the development of different polymeric supports with potential use for the immobilization of different enzymes and with promising applications in distinct industrial sectors.

# Índice

<b>Capítulo I. Introdução</b> .....	<b>1</b>
1.1. Introdução .....	1
1.2. Objetivo da Tese .....	5
1.2.1. Objetivo Geral .....	5
1.2.2. Objetivos Específicos .....	5
1.3. Estrutura da Tese .....	6
<b>Capítulo II. Síntese de Suportes Poliméricos</b> .....	<b>8</b>
2.1. Revisão Bibliográfica .....	8
2.1.1. Mecanismos de Processos de Polimerização .....	8
2.1.1.1. Polimerização em Cadeia Via Radicais Livres .....	9
2.1.1.2. Copolimerização em Cadeia Via Radicais Livres .....	10
2.1.2. Processos de Polimerização .....	11
2.1.3. Processos de Polimerização em Suspensão .....	12
2.1.4. Processos de Polimerização em Emulsão .....	16
2.1.5. Processos de Síntese de Partículas Poliméricas com Estrutura Casca-Núcleo .....	23
2.1.6. Partículas Casca-Núcleo Sintetizadas a partir da Polimerização em Suspensão e Emulsão Simultâneas.....	34
2.1.7. Comentários Finais .....	39
2.2. Materiais e Metodologias em Escala Bancada .....	40
2.2.1. Materiais em Escala Bancada .....	41
2.2.2. Metodologia em Escala Bancada .....	42
2.2.3. Caracterização das Partículas Poliméricas.....	47
2.2.3.1. Microscopia Óptica (MO) .....	48
2.2.3.2. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	49
2.2.3.3. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....	49
2.2.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC) .....	51
2.2.3.5. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro, Volume Específico de Poros .....	52
2.2.3.6. Distribuição de Tamanhos de Partícula .....	53



2.2.3.7. Análise de Resistência Mecânica .....	54
2.2.3.8. Determinação da Conversão, do Rendimento da Reação e do Teor de Sólidos .....	55
2.3. Resultados em Escala Bancada .....	56
2.3.1. Influência da Vazão de Alimentação de Comonômeros na Morfologia das Partículas Casca-núcleo.....	57
2.3.1.1. Análise Cinética e Rendimento .....	58
2.3.1.2. Análises do Látex .....	60
2.3.1.3. Temperatura de Transição Vítrea.....	64
2.3.1.4. Distribuição das Massas Molares das Partículas Casca-núcleo .....	64
2.3.1.5. Morfologia das Partículas Casca-núcleo .....	65
2.3.1.6. Resistência Mecânica das Partículas Produzidas.....	74
2.3.2. Comparação das Propriedades Morfológicas das Partículas do Núcleo, das Nanopartículas da Casca e das Partículas Casca-núcleo .....	80
2.3.2.1. Análise Cinética e Rendimento .....	81
2.3.2.2. Análises do Látex .....	82
2.3.2.3. Distribuição das Massas Molares das Partículas Casca-núcleo .....	84
2.3.2.4. Morfologia das Partículas Produzidas .....	85
2.3.3. Diferentes Estratégias para Aumento da Área Específica e Porosidade das Partículas Casca-núcleo.....	88
2.3.3.1. Análise Cinética e Rendimento .....	90
2.3.3.2. Análises do Látex .....	92
2.3.3.3. Distribuição das Massas Molares das Partículas Casca-núcleo .....	95
2.3.3.4. Morfologia das Partículas Casca-núcleo .....	95
2.3.3.5. Resistência Mecânica das Partículas Produzidas.....	102
2.4. Conclusões Parciais.....	105
2.5. Materiais e Metodologias em Escala Piloto .....	106
2.5.1. Materiais .....	106
2.5.2. Metodologia em Escala Piloto .....	107
2.5.3. Caracterização das Partículas Poliméricas .....	110

2.5.3.1. Ângulo de Contato .....	110
2.6. Resultados em Escala Piloto .....	111
2.7. Conclusões Parciais .....	117
<b>Capítulo III. Imobilização Enzimática .....</b>	<b>119</b>
3.1. Revisão Bibliográfica .....	119
3.1.1. Métodos de Imobilização Enzimática.....	119
3.1.2. Efeitos da Imobilização no Desempenho das Enzimas.....	123
3.1.3. Efeitos da Imobilização na Estabilidade das Enzimas.....	125
3.1.4. Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CAL-B) .....	126
3.1.5. Interação entre Enzimas e Suportes no Processo de Imobilização .....	128
3.1.6. Suportes Poliméricos Empregados na Imobilização Enzimática.....	131
3.1.7. Suportes Poliméricos Sintetizados a partir do Processo de Polimerização em Suspensão-Emulsão Empregados na Imobilização Enzimática .....	137
3.1.9. Comentários Finais.....	141
3.2. Materiais e Metodologias .....	142
3.2.1. Materiais .....	143
3.2.2. Metodologia.....	145
3.2.2.1. Metodologia – Imobilização por Adsorção Física.....	145
3.2.3. Avaliação de Desempenho dos Biocatalisadores Produzidos ....	147
3.2.3.1. Cinética de Imobilização Avaliada por Atividade Hidrolítica .....	148
3.2.3.2. Atividade de Hidrólise do Biocatalisador.....	150
3.2.3.3. Atividade de Esterificação do Biocatalisador.....	151
3.2.3.4. Cinética de Imobilização Avaliada por Concentração de Proteína.....	153
3.3. Resultados .....	154
3.3.1. Avaliação do Desempenho das Partículas Casca-núcleo .....	154
3.3.2. Avaliação da Carga Máxima Enzimática Adsorvida ao Suporte .....	161

3.3.3. Avaliação dos Suportes Produzidos em Escala Piloto na Síntese de Biocatalisadores .....	165
3.4. Conclusões Parciais .....	174
<b>Capítulo IV. Funcionalização das Nanopartículas Poliméricas .....</b>	<b>175</b>
4.1. Revisão Bibliográfica .....	176
4.1.1. <i>Click Chemistry</i> .....	178
4.1.2. Comentários Finais .....	180
4.2. Funcionalização das Matrizes Poliméricas .....	181
4.2.1. Materiais e Metodologias .....	181
4.2.1.1. Cromatografia Gasosa (GC) .....	185
4.2.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	186
4.2.1.3. Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) .....	187
4.2.2. Resultados .....	187
4.2.2.1. Incorporação do GMA às Matrizes Poliméricas .....	187
4.2.2.2. Incorporação do PFS às Matrizes Poliméricas .....	192
4.2.2.2. Funcionalização das Matrizes Poliméricas .....	196
4.3. Funcionalização das Nanopartículas Poliméricas .....	205
4.3.1. Materiais e Metodologias .....	206
4.3.1.1. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) .....	210
4.3.2. Resultados .....	210
4.4. Conclusões Parciais .....	224
<b>Capítulo V. Conclusão .....</b>	<b>226</b>
5.1. Sugestões .....	228
<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>230</b>
<b>Apêndice A .....</b>	<b>254</b>
<b>Apêndice B .....</b>	<b>256</b>
<b>Apêndice C .....</b>	<b>259</b>
<b>Apêndice D .....</b>	<b>261</b>

# Lista de Figuras

Figura 1. Trabalhos publicados na literatura científica, de acordo com a base de dados Web of Knowledge (2017), relacionados às palavras-chave <i>polymerization</i> e <i>core-shell</i> .....	24
Figura 2. Processos que envolvem a síntese de nanopartículas com morfologia casca-núcleo .....	28
Figura 3. Partícula sintetizada a partir da técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão .....	34
Figura 4. Processo de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas.....	35
Figura 5. Mecanismo de formação das partículas com morfologia casca-núcleo.....	37
Figura 6. Unidade Experimental em escala de bancada: (A) Esquema ilustrativo; (B) Unidade empregada para produção das partículas casca-núcleo .....	43
Figura 7. Análise cinética de cada uma das reações de polimerização realizadas .....	59
Figura 8. Rendimento de cada uma das reações realizadas .....	60
Figura 9. Teor de sólidos presentes no látex ao final de cada uma das reações realizadas .....	61
Figura 10. Distribuição de tamanhos das partículas do sobrenadante correspondente a cada reação .....	62
Figura 11. Partículas emulsificadas não solubilizadas em THF: (A) $V=0,019$ L/h; (B) $V=0,032$ L/h; (C) $V=0,069$ L/h; (D) $V=0,076$ L/h; (E) $V=0,122$ L/h.....	63
Figura 12. Partículas casca-núcleo não solubilizadas em THF: (A) $V=0,069$ L/h; (B) $V=0,076$ L/h; (C) $V=0,122$ L/h .....	65
Figura 13. Micrografias das partículas casca-núcleo produzidas a partir das diferentes condições operacionais: (A) PS-co-DVB (núcleo); (B) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; $V=0,032$ L/h); (C) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; $V=0,019$ L/h); (D) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; $V=0,037$ L/h); (E) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; $V=0,069$ L/h); (F) PS/PS (casca-núcleo à base apenas de poliestireno; $V=0,035$ L/h) .....	66

Figura 14. Micrografias eletrônicas das partículas produzidas a partir das diferentes condições operacionais: (A) PS-co-DVB (núcleo); (B) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; V=0,032 L/h; (C) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; V=0,076 L/h); (D) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; V=0,122 L/h); (E) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; V=0,019 L/h); (F) PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo; V=0,069 L/h).	67
Figura 15. Distribuição de tamanhos das partículas com morfologia casca-núcleo	68
Figura 16. Influência da vazão no diâmetro médio das partículas com morfologia casca-núcleo	70
Figura 17. Influência da vazão de alimentação nas seguintes propriedades morfológicas das partículas casca-núcleo: (A) área específica; (B) volume específico de poros; (C) diâmetro médio de poro	72
Figura 18. Relação existente entre as propriedades morfológicas dos suportes: (A) área específica e volume específico de poros; (B) área específica e diâmetro médio de poros	73
Figura 19. Relação existente entre o diâmetro médio de poro e o diâmetro médio das partículas emulsificadas	73
Figura 20. Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação de 200 rpm: (A) PS-co-DVB; (B) PS	75
Figura 21. Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 400 rpm: (A) PS-co-DVB; (B) PS	75
Figura 22. Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 800 rpm: (A) PS-co-DVB; (B) PS	76
Figura 23. Comparação entre os diâmetros médios dos núcleos poliméricos: (A) PS-co-DVB; (B) PS	76
Figura 24. Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 200 rpm: (A) PS-co-DVB/PS-co-DVB; (B) PS/PS	77
Figura 25. Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 400 rpm: (A) PS-co-DVB/PS-co-DVB; (B) PS/PS	78
Figura 26. Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 800 rpm: (A) PS-co-DVB/PS-co-DVB; (B) PS/PS	79
Figura 27. Comparação entre os diâmetros médios das partículas com morfologia casca-núcleo: (A) PS-co-DVB/PS-co-DVB; (B) PS/PS	80
Figura 28. Análise cinética das reações realizadas no segundo bloco de experimentos	82

Figura 29. Rendimentos das reações executadas no segundo bloco de experimentos .	82
Figura 30. Teor de sólidos presentes no látex ao final das reações segundo bloco de experimentos .....	83
Figura 31. Distribuição de tamanhos das partículas presentes no látex ao final de cada reação do segundo bloco de experimentos .....	84
Figura 32. Micrografias ópticas e eletrônicas, respectivamente, das partículas casca-núcleo produzidas no segundo bloco de experimentos: (A) e (B) núcleos de PS-co-DVB; (C) e (D) casca-núcleo de PS-co-DVB/ PS-co-DVB; (E) e (F) nanopartículas de PS-co-DVB .....	86
Figura 33. Distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo produzidas no segundo bloco de experimentos .....	87
Figura 34. Diâmetro médio das partículas produzidas no segundo bloco de experimentos .....	87
Figura 35. Análise cinética das diferentes reações realizadas no terceiro bloco de experimentos .....	91
Figura 36. Rendimento das diferentes reações realizadas .....	91
Figura 37. Teor de sólidos dos sobrenadantes de cada uma das reações realizadas.....	92
Figura 38. Distribuição de tamanhos das partículas presentes no látex ao final de cada reação.....	94
Figura 39. Micrografias das partículas casca-núcleo produzidas no terceiro bloco de experimentos e dos materiais comerciais: (A) MO das partículas da Reação 11 (Menor Conversão (0,67 h)); (B) MEV das partículas da Reação 11 (Menor Conversão (0,67 h)); (C) MO das partículas da Reação 16; (D) MEV das partículas da Reação 16; (E) MEV do suporte comercial Accurel; (F) MEV do biocatalisador comercial Novozym 435.. .....	96
Figura 40. Distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo produzidas no terceiro bloco de experimentos .....	98
Figura 41. Diâmetro médio das partículas casca-núcleo produzidas no terceiro bloco de experimentos. ....	99
Figura 42. Área específica das partículas casca-núcleo obtidas no terceiro bloco de experimentos .....	101
Figura 43. Relação existente entre a área específica e o volume específico de poros das partículas casca-núcleo produzidas .....	102

Figura 44. Distribuição de tamanhos de partícula (Reação 16; Menor Conversão (0,67 h) e Maior Teor de DVB) empregando-se uma velocidade de agitação igual a: (A) 200 rpm; (B) 800 rpm. ....	103
Figura 45. Distribuição de tamanhos de partículas da Novozym 435 empregando-se uma velocidade de agitação igual a: (A) 200 rpm; (B) 800 rpm. ....	103
Figura 46. Comparação entre os diâmetros médios das partículas: (A) Casca-núcleo D16; (B) Novozym 435 .....	105
Figura 47. Unidade em escala piloto utilizada para a produção das partículas com morfologia casca-núcleo .....	108
Figura 48. Morfologia dos suportes poliméricos produzidos: (A) Partículas obtidas ao final da reação Piloto_1 (PMMA/PMMA); (B) MEV da partícula produzida a partir da reação Piloto_1 (PMMA/PMMA); (C) MO das partículas produzidas na reação Piloto_3 (PMMA/PMMA); (D) MEV das partículas produzidas na reação Piloto_3 (PMMA/PMMA); (E) MO das partículas produzidas na reação Piloto_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)); (F) MEV dos aglomerados formados na reação Pioto_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)).....	112
Figura 49. Distribuição de tamanho de partícula dos suportes sintetizados em larga escala .....	113
Figura 50. Relação existente entre o diâmetro médio de partícula e a área específica de tais partículas .....	117
Figura 51. Mecanismo de adsorção de lipases a suportes hidrofóbicos .....	127
Figura 52. Mecanismo de imobilização enzimática por ligação covalente .....	129
Figura 53. Fatores que afetam o desempenho do biocatalisador .....	130
Figura 54. Trabalhos publicados na literatura científica, de acordo com a base de dados Web of Knowledge (2017), usando as palavras-chave lipase, immobilization e core-shell .....	138
Figura 55. Unidade experimental empregada para a imobilização enzimática .....	147
Figura 56. Análise cinética das imobilizações realizadas baseando-se na atividade de hidrólise ainda presente no sobrenadante ao longo do período de imobilização: (A) Valores absolutos (U/gsuporte); (B) Valores normalizados pela atividade enzimática inicial .....	155
Figura 57. Análise cinética das imobilizações realizadas baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização: (A) Valores	

absolutos (mgptn/gsuporte); (B) Valores normalizados pela concentração inicial de proteína .....	157
Figura 58. Atividade dos biocatalisadores produzidos considerando o primeiro bloco de imobilizações: (A) Hidrólise; (B) Esterificação .....	160
Figura 59. Atividade de hidrólise dos biocatalisadores produzidos considerando o primeiro e o segundo bloco de imobilizações .....	164
Figura 60. Atividade de esterificação das enzimas imobilizadas considerando o primeiro e o segundo blocos de reações .....	165
Figura 61. Análise cinética das imobilizações realizadas baseando-se na atividade de hidrólise durante o período de imobilização: (A) Valores Absolutos (U/gsuporte); (B) Valores normalizados pela atividade enzimática inicial. ....	166
Figura 62. Análise cinética das imobilizações realizadas baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização: (A) Valores Absolutos (mgptn/gsuporte); (B) Valores normalizados pela concentração proteica inicial .....	168
Figura 63. Atividade de hidrólise dos diferentes biocatalisadores produzidos, empregando-se os suportes sintetizados em larga escala .....	171
Figura 64. Atividade de esterificação dos diferentes biocatalisadores sintetizados, empregando-se os suportes sintetizados em larga escala .....	172
Figura 65. Utilização do metacrilato de glicidila em diferentes tipos de reações de funcionalização de Click Chemistry, destacando-se as reações com aminas e tióis, como compostos funcionais .....	184
Figura 66. Uso do pentafluoroestireno em reações de funcionalização do tipo Click Chemistry (usando-se tióis e aminas) .....	184
Figura 67. Conversão de cada um dos monômeros (Reação 17; 50% GMA), obtida a partir da análise: (A) GC; (B) RMN .....	189
Figura 68. Espectros de RMN obtidos para a Reação 05 (P(S-co-GMA), 50%GMA): t0 (espectro obtido no início da reação) e tf (espectro encontrado ao final da reação de polimerização)... ..	189
Figura 69. Espectros de RMN obtidos para os materiais poliméricos de (P(S-co-GMA), 50%GMA): R05tf (solução polimérica obtida ao final da reação de polimerização); R05 1st (material polimérico produzido após a primeira etapa de purificação); R05 2nd (material polimérico final, produzido ao final da segunda etapa de polimerização)....	190



Figura 70. Distribuição das massas molares das cadeias poliméricas dos diferentes polímeros produzidos .....	191
Figura 71. Espectros de RMN obtidos para cada um dos polímeros produzidos e purificados.....	192
Figura 72. Espectros de RMN das soluções poliméricas produzidas (P(S-co-PFS); 50%PFS): t <sub>0</sub> (início da reação) e t <sub>f</sub> (solução polimérica obtida ao final da reação).....	193
Figura 73. Distribuição das massas molares das cadeias poliméricas dos polímeros produzidos no segundo bloco de experimentos .....	194
Figura 74. Espectros de RMN dos diferentes polímeros produzidos e purificados, <sup>1</sup> H .....	195
Figura 75. Espectros de RMN dos polímeros produzidos e purificados, <sup>19</sup> F .....	195
Figura 76. Compostos funcionais empregados nas reações de funcionalização .....	196
Figura 77. Grupos funcionais inseridos às cadeias poliméricas após a reação de funcionalização .....	197
Figura 78. Distribuição de massas molares dos polímeros produzidos após as reações de funcionalização: (A) (P(S-co-GMA); 10%GMA); (B) (P(S-co-GMA); 50%GMA) ..	199
Figura 79. Distribuição das massas molares dos polímeros produzidos após as reações de funcionalização: (A) (P(S-co-PFS); 10%PFS); (B) (P(S-co-PFS); 50%PFS) .....	201
Figura 80. Espectros de RMN dos polímeros produzidos e purificados após as reações de funcionalização (P(S-co-GMA); 10%GMA) .....	203
Figura 81. Espectros de <sup>1</sup> H RMN dos polímeros produzidos e purificados após as reações de funcionalização, (P(S-co-PFS); 50%PFS). .....	204
Figura 82. Espectros de <sup>19</sup> F RMN dos polímeros produzidos e purificados após as reações de funcionalização, (P(S-co-PFS); 50%PFS) .....	204
Figura 83. Grupamentos funcionais que se espera adicionar às nanopartículas formadoras da casca das partículas casca-núcleo.....	205
Figura 84. Esquema das estratégias de funcionalização das partículas poliméricas ...	208
Figura 85. Morfologia das partículas produzidas: (A) EP 10 (P(S-co-DVB-co-GMA); 50%GMA); (B) EP 16 (P(S-co-DVB-co-PFS); 50%PFS); (C) MO: EP 02 (P(S-co-DVB)); (D) MO: EP10 (P(S-co-DVB-co-GMA); 50%GMA); (E) MEV: EP 19 (IS (50%GMA; Benzilamina)); (F) MEV: EP 21 (IS (50%GMA; Tiofenol)); (G) MEV: EP 25 (IS (50%PFS; Tiofenol)).....	211

Figura 86. Diâmetro médio das partículas produzidas nas reações de funcionalização pós-polimerização.....	215
Figura 87. Diâmetro médio das partículas produzidas nas reações de funcionalização <i>in situ</i> .....	216
Figura 88. Resultados de FTIR das partículas à base de 50% GMA funcionalizadas por ambas as estratégias .....	218
Figura 89. Resultados de FTIR das partículas à base de 50% PFS funcionalizadas por ambas as estratégias .....	218
Figura 90. Correlação entre as transmitâncias dos diferentes espectros de FTIR: (A) Partículas sem grupamentos de GMA ou PFS submetidas a reação de pós-polimerização; (B) Partículas contendo 50% de GMA submetidas à funcionalização pós-polimerização; (C) Partículas contendo 50% de PFS submetidas à funcionalização pós-polimerização.....	220
Figura 91. Correlação entre as transmitâncias dos diferentes espectros de FTIR: (A) Partículas contendo 50% de GMA funcionalizadas <i>in situ</i> ; (B) Partículas contendo 50% de PFS funcionalizadas <i>in situ</i> .....	221
Figura 92. Suportes poliméricos que se deseja sintetizar nas próximas etapas do trabalho.....	225
Figura B.1. Curva de DSC do produto da Reação 01 .....	256
Figura B.2. Curva de DSC do produto da Reação 02 .....	256
Figura B.3. Curva de DSC do produto da Reação 03 .....	257
Figura B.4. Curva de DSC do produto da Reação 04 .....	257
Figura B.5. Curva de DSC do produto da Reação 05 .....	257
Figura B.6. Curva de DSC do produto da Reação 06 .....	258
Figura B.7. Curva de DSC do produto da Reação 07 .....	258
Figura C.1. Isotermas: (A) Reação 13 (Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)); (B) Reação 14 (Nanopartículas; P(S-co-DVB)).....	259
Figura C.2. Isotermas: (A) Reação 16 (Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)); (B) Piloto_1 (Casca-núcleo; PMMA/PMMA).....	259
Figura C.3. Isotermas: (A) Piloto_4 (Casca-núcleo; P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)); (B) Piloto_5 (Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)).....	260
Figura C.4. Isotermas: (A) Accurel; (B) Novozym 435.....	260

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Percentagem mássica de cada um dos componentes adicionados na etapa de polimerização em suspensão, utilizando como base 100 g de mistura monomérica .....	46
Tabela 2. Percentagem mássica de cada um dos componentes adicionados na etapa de polimerização em emulsão, empregando como base 100 g de mistura monomérica ....	47
Tabela 3. Condições operacionais empregadas em cada uma das diferentes reações realizadas.....	48
Tabela 4. Vazão de alimentação correspondentes a cada uma das diferentes reações realizadas no primeiro bloco de experimentos .....	58
Tabela 5. Diâmetro médio das partículas presentes no sobrenadante ao final de cada uma das reações realizadas .....	63
Tabela 6. Diâmetro médio das partículas casca-núcleo produzidas no primeiro bloco de experimentos.....	69
Tabela 7. Características morfológicas das partículas casca-núcleo produzidas no primeiro bloco de experimentos .....	70
Tabela 8. Condições operacionais de cada uma das diferentes reações realizadas no segundo bloco de experimentos .....	81
Tabela 9. Diâmetro médio das partículas presentes no sobrenadante conduzidas no segundo bloco de experimentos .....	84
Tabela 10. Propriedades morfológicas das partículas obtidas no segundo bloco de experimentos .....	88
Tabela 11. Reações realizadas no terceiro bloco de experimentos .....	89
Tabela 12. Diâmetro médio das partículas do sobrenadante do terceiro bloco de reações... ..	95
Tabela 13. Características morfológicas das partículas casca-núcleo obtidas no terceiro bloco de experimentos .....	99
Tabela 14. Condições operacionais das reações realizadas em larga escala. ....	109
Tabela 15. Diâmetro médio das partículas casca-núcleo produzidas em larga escala. ....	114
Tabela 16. Características morfológicas dos suportes produzidos em larga escala ...	115
Tabela 17. Características morfológicas dos suportes produzidos e utilizados no processo de imobilização .....	144
Tabela 18. Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações .....	159

Tabela 19. Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações realizadas no segundo bloco de imobilizações .....	163
Tabela 20. Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações empregando-se os suportes produzidos em larga escala .....	170
Tabela 21. Atividades normalizadas dos biocatalisadores .....	173
Tabela 22. Reações realizadas no primeiro bloco de experimentos .....	183
Tabela 23. Reações realizadas no segundo bloco de experimentos .....	183
Tabela 24. Conversão de cada um dos monômeros em cada uma das reações realizadas .....	188
Tabela 25. Massa molar numérica média (Mn) de cada um dos polímeros produzidos no primeiro bloco de reações. ....	191
Tabela 26. Conversão de cada um dos monômeros em cada uma das reações do segundo bloco de experimentos .....	193
Tabela 27. Massas molares médias de cada um dos copolímeros produzidos no segundo bloco de experimentos .....	194
Tabela 28. Conversão de cada uma das reações de funcionalização.....	198
Tabela 29. Massas molares numéricas médias (Mn) dos polímeros produzidos após a funcionalização do grupo epóxido .....	200
Tabela 30. Massas molares numéricas médias (Mn) dos polímeros produzidos após a funcionalização do flúor. ....	200
Tabela 31. Ângulo de contato obtido para os diferentes materiais produzidos.. .....	202
Tabela 32. Primeira etapa da reação de polimerização pós-polimerização .....	208
Tabela 33. Etapa de funcionalização das nanopartículas pós-polimerização (PP).....	209
Tabela 34. Reações de polimerização e funcionalização in situ (IS). ....	209
Tabela 35. Conversão e rendimento das reações correspondentes à primeira etapa da funcionalização pós-polimerização . ....	212
Tabela 36. Rendimento das reações de funcionalização pós-polimerização .....	213
Tabela 37. Conversão e rendimento das reações de funcionalização in situ.....	214
Tabela 38. Diâmetro médio das partículas produzidas nas reações de funcionalização pós-polimerização.....	215
Tabela 39. Diâmetro médio das partículas das reações de funcionalização in situ. ....	216
Tabela 40. Área específica das partículas produzidas a partir das reações de funcionalização pós-polimerização .....	222

Tabela 41. Área específica obtida para as partículas produzidas a partir das reações de funcionalização in-situ.....	222
Tabela 42. Ângulo de contato obtido para as partículas produzidas a partir das reações de funcionalização pós-polimerização.....	222
Tabela 43. Ângulo de contato obtido para as partículas produzidas a partir das reações de funcionalização in situ .....	224

## Lista de Equações

Equação 1. Cálculo do rendimento .....	55
Equação 2. Cálculo do teor de sólidos .....	56
Equação 3. Cálculo da atividade de hidrólise da enzima solúvel.....	149
Equação 4. Cálculo do rendimento de imobilização.....	150
Equação 5. Cálculo da atividade hidrolítica do biocatalisador.....	151
Equação 6. Cálculo da retenção de atividade .....	151
Equação 7. Cálculo da atividade de esterificação da enzima imobilizada .....	152
Equação 8. Cálculo da concentração de proteína ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização .....	153
Equação A.1. Cálculo da massa total de monômero alimentada entre cada tempo de amostragem na etapa de emulsão alimentada.....	254
Equação A.2. Cálculo da massa total de monômero alimentada até o intervalo de tempo N+1 .....	254
Equação A.3. Cálculo da massa total presente no reator até o intervalo de tempo N+1.....	255
Equação A.4. Cálculo de percentagem mássica de cada um dos componentes presentes no meio reacional no tempo N+1.....	255
Equação A.5. Cálculo da conversão no tempo N+1.....	255

# Nomenclatura

$\eta$	Rendimento de imobilização
$A_{\text{esp}}$	Área específica
$A_{\text{H}}$	Atividade hidrolítica da enzima solúvel
$A_{\text{imoester}}$	Atividade de esterificação da enzima imobilizada
$A_{\text{imohid}}$	Atividade hidrolítica do biocatalisador
BPO	Peróxido de Benzoíla
CAL-B	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
$D_p$	Diâmetro médio de poro
$d_p$	Diâmetro médio de partícula
DVB	Divinilbenzeno
GMA	Metacrilato de Glicidila
I	Iniciador
PDi	Índice de polidispersão
$M_{n,\text{SEC}}$	Massa molar ponderal média
MMA	Metacrilato de metila
M	Monômero
$P_i^*$	Cadeia polimérica em crescimento de tamanho i
$P_i^-$	Cadeia polimérica de tamanho j contendo insaturação
$P_j$	Cadeia polimérica de tamanho j
$P_1^*$	Polímero em crescimento cuja espécie reativa está associada ao monômero $M_1$ .
$P_2^*$	Polímero em crescimento cuja espécie reativa está associada ao monômero $M_2$ .
PFS	Pentafluoroestireno
PMMA	Poli(metacrilato de metila)
PS	Poli(estireno)
P(S-co-DVB)	Poli(estireno-co-divinilbenzeno)
P(MMA-co-DVB)	Poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno)
PMMA/PMMA	Partícula com casca e núcleo de poli(metacrilato de metila)

P(MMA-co-DVB)/	Partícula com casca e núcleo de Poli(metacrilato de
P(MMA-co-DVB)	metila-co-divinilbenzeno)
P(S-co-DVB)/ P(S-co-DVB)	Partícula com casca e núcleo de poli(estireno-co- divinilbenzeno)
PVA	Poli(álcool vinílico)
r	Rendimento
R*	Radical livre
RM	<i>Rhizomucor miehei</i>
RML	Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i>
S	Estireno
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
TL	<i>Thermomyces lanuginosus</i>
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
TS	Teor de sólidos
V <sub>esp</sub>	Volume específico de poros



# *Capítulo I*

## **Introdução**

### **1.1. Introdução**

As enzimas são biocatalisadores naturais, sintetizados por animais, vegetais e microrganismos, capazes de catalisar e promover reações químicas (VAN BEILEN e LI, 2002; MUSSATO *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2012). A melhor compreensão sobre a estrutura destas proteínas e seus mecanismos de ação, além dos pronunciados avanços na área de engenharia genética e da procura por processos baseados em tecnologias sustentáveis, possibilitaram e favoreceram a expansão da aplicação desses biocatalisadores em diferentes processos industriais e em diversas áreas do conhecimento, como na área alimentícia, têxtil, de papel e celulose, de cosméticos, de biocombustíveis, de tratamento de efluentes, dentre outras (BUCHERT *et al.*, 1994; OZLEN, 1995; VAN BEILEN e LI, 2002; MENDES *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007c; RIBEIRO *et al.*, 2011; CHALAMAIAH *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2012). No setor farmacêutico, por exemplo, essas proteínas têm assumido papel de destaque, uma vez que é cada vez mais intensa a busca por compostos enantioméricos puros (em lugar das misturas racêmicas) (BOMMARIUS *et al.*, 1998; CHARTRAIN *et al.*, 2000; PATEL, 2001; GOTOR, 2002; JAEGER e EGGERT, 2002).

Esses biocatalisadores são de grande interesse para as indústrias, pois, em geral, atuam sob condições operacionais mais brandas e apresentam comumente altas atividade, seletividade e especificidade, possibilitando a geração de produtos mais puros (FREIRE, 1988; KOELLER e WONG, 2001; MATEO *et al.*, 2007; MUSSATO *et al.*, 2007; CAO e LIU, 2009). Nesse contexto, as lipases têm recebido destaque, uma vez que são capazes de catalisar reações de hidrólise, esterificação e transesterificação, apresentando enorme versatilidade em diferentes tipos de sínteses orgânicas e exibindo elevadas especificidade e seletividade (GOTOR, 2002; JAEGER e EGGERT, 2002; FREIRE e CASTILHO, 2008; CUNHA *et al.*, 2014).

Nos últimos anos o mercado global de enzimas tem crescido de forma pronunciada. Em 2015, o mercado mundial dessas proteínas foi de 8,18 bilhões de

dólares e é esperado que cresça para 17,50 bilhões de dólares em 2024, segundo dados da Grand View Research (GRAND VIEW RESEARCH, 2016). Ao analisar o mercado brasileiro, é possível notar inicialmente uma dificuldade de obtenção de dados atuais. Contudo, ao analisar o mercado em 2005, observa-se uma defasagem do mercado nacional em relação a mercados mundiais. Em 2005, por exemplo, as importações totalizaram US\$ 126,6 milhões e as exportações US\$ 20,6 milhões; ou seja, aproximadamente 3,7 % do mercado mundial (BON *et al.*, 2008).

A importância da biocatálise, tendo em vista a necessidade cada vez maior por processos sustentáveis, é evidente por tudo que foi apresentado. Dessa forma, a busca pelo desenvolvimento de processos sustentáveis e economicamente viáveis, tem despertado o interesse por uma técnica antiga, que tem se revelado nos últimos anos como uma poderosa ferramenta para melhorar as propriedades enzimáticas (estabilidade, atividade, especificidade, seletividade): a imobilização enzimática (MATEO *et al.*, 2007; SHELDON e VAN PELT, 2013). A técnica de imobilização objetiva tornar a enzima insolúvel no meio em que se encontram substratos e produtos (SHELDON e PELT, 2013).

O procedimento de imobilização enzimática possibilita a reutilização dos biocatalisadores e a condução de processos contínuos, uma vez que em processos conduzidos em fase homogênea (enzimas na forma solúvel) há necessidade de repor o catalisador a cada reação realizada. Dessa forma, por meio da imobilização é possível recuperar a enzima imobilizada ao final de cada operação e reutilizá-la em outros processos. Esta técnica provoca também a diminuição do risco de contaminação do produto por resíduos de enzimas, possibilitando ainda o uso de volumes reacionais mais reduzidos. Além disso, em função dos fenômenos de superfície, diversas propriedades enzimáticas podem ser potencializadas com o processo de imobilização, como atividade e estabilidade, tanto em relação ao aspecto operacional quanto em relação à estocagem (FREIRE, 1988; MATEO *et al.*, 2007; SHELDON e PELT, 2013).

É importante destacar que, para que um material possa ser empregado como suporte para imobilização enzimática, o material deve possuir um preço atrativo e apresentar algumas características específicas, como ser insolúvel na fase do substrato e produto, ser estável mecanicamente e apresentar determinado grau de interação com a enzima (de forma a evitar a dessorção, mas sem provocar a desativação do sítio ativo) (KAHRAMAN *et al.*, 2007; DATTA *et al.*, 2013; PINTO *et al.*, 2014). Assim, diversos

materiais podem ser empregados como suporte: materiais inorgânicos (sílica, alumina, apatita, carvão ativado), polímeros naturais (alginato, celulose, gelatina, colágeno) e polímeros sintéticos (poliacrilamida, poliestireno) (KAHRAMAN *et al.*, 2007; DATTA *et al.*, 2013). No entanto, cada enzima interage de maneira particular com cada tipo de suporte, apresentando atividade característica após a imobilização, a depender do suporte utilizado. Dessa forma, os polímeros sintéticos têm recebido especial destaque, pois são de fácil produção e, em geral, apresentam baixo custo de síntese. Além disso, algumas das suas características podem ser manipuladas para viabilizar uma melhor interação entre a enzima e o suporte, como composição, porosidade, tamanho característico e a funcionalidade da superfície, por meio da introdução de grupamentos químicos específicos (BESTETI, 2011; PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2014).

Nesse contexto, a síntese de suportes enzimáticos do tipo casca-núcleo a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas é muito vantajosa, uma vez que possibilita a produção de partículas porosas em escala micrométrica e permite a funcionalização da casca e do núcleo polimérico, sem haver a necessidade de etapas adicionais de reação. Assim, suportes poliméricos com diferentes propriedades podem ser produzidos, a depender das características intrínsecas de cada enzima que deve ser imobilizada (BESTETI, 2011; PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2014). Essa área, ainda pouco desenvolvida no país, genericamente chamada de “Engenharia de Suportes”, busca o desenvolvimento de materiais que interajam da melhor forma com uma enzima específica, resultando em biocatalisadores de máximo desempenho.

Diante do exposto, o presente trabalho visou à produção de biocatalisadores com atividade lipásica, avaliando o desempenho em reações de hidrólise (utilizando *p*-nitrofenil laurato como substrato) e em reações de esterificação (empregando ácido oleico e etanol como substratos). A lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) comercial foi a enzima empregada ao longo do trabalho, uma vez que é uma enzima largamente utilizada na biocatálise, capaz de catalisar inúmeras reações, apresentando elevadas estabilidade e atividade. O termo “biocatalisador”, empregado no trabalho, está associado ao suporte com a enzima adsorvida; ou seja, a enzima já imobilizada.

Assim, inicialmente, foram produzidas novas partículas com morfologia casca-núcleo, a partir da técnica de polimerização em suspensão-emulsão simultâneas, adotando-se diferentes estratégias de reação. Dessa forma, buscou-se sintetizar suportes com áreas específicas e porosidades mais pronunciadas. Diversos monômeros foram

empregados para a síntese do núcleo e da casca polimérica, como divinilbenzeno, estireno e metacrilato de metila, objetivando obter partículas com as características morfológicas e químicas almejadas. A estabilidade mecânica de tais partículas casca-núcleo também foi estudada.

Em uma etapa subsequente, esses materiais poliméricos foram utilizados como suporte para a síntese dos biocatalisadores, empregando a técnica de imobilização enzimática por adsorção física. Os parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização e retenção de atividade, também foram avaliados. As enzimas imobilizadas foram empregadas em reações de hidrólise e esterificação.

A partir de então, foi iniciado um estudo de escalonamento do processo de polimerização (nunca estudado em larga escala), empregando diferentes comonômeros para síntese de partículas com composições distintas. Por fim, um estudo de funcionalização das nanopartículas formadoras da casca polimérica foi conduzido. Para isso, duas estratégias de funcionalização foram avaliadas: funcionalização pós-polimerização (primeiramente há a síntese das partículas e, em seguida, a funcionalização do material polimérico); funcionalização *in situ* (a reação de funcionalização acontece durante o próprio processo de polimerização, envolvendo uma única etapa reacional) (BECER *et al.*, 2009; BESTETI, 2011; BESTETI *et al.*, 2014b). Dessa forma, explorando as reações de *Click Chemistry*, buscou-se produzir partículas com funcionalidades diferentes e capazes de interagir de forma distinta com a enzima estudada.

As etapas relacionadas ao sistema de polimerização, assim como ao escalonamento do processo, foram desenvolvidas no Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol/PEQ/COPPE). As etapas relacionadas à área de bioprocessos foram realizadas no Laboratório de Biotecnologia Microbiana (LABIM/IQ). Por fim, o estudo de funcionalização das nanopartículas poliméricas foram conduzidas no Polymer Chemistry Laboratory, na *Queen Mary University of London*, durante o período do doutorado sanduíche. Esta interação multidisciplinar possibilitou o desenvolvimento de suportes mais promissores para a imobilização de diversas enzimas. Além disso, o desenvolvimento de alguns dos suportes poliméricos, assim como o escalonamento do processo de polimerização e o estudo de avaliação da estratégia de funcionalização mais eficiente das nanopartículas, ainda não haviam sido realizados em nenhum estudo anterior.

É importante ressaltar que estudos envolvendo a funcionalização de materiais poliméricos, o desenvolvimento de suportes enzimáticos empregando enzimas *home-made* e a síntese de novos biocatalisadores ainda são incipientes no Brasil. Ademais, são poucos os trabalhos da literatura internacional que reúnem todas as etapas de síntese e de aplicação de novos biocatalisadores, havendo uma ampla lacuna na área de Engenharia de Suportes que pode ser preenchida por uma tecnologia de caráter nacional.

Vale pontuar também que o presente estudo encontra-se em um contexto mais amplo, com bom potencial comercial, uma vez que objetiva produzir suportes e biocatalisadores multipropósito, que possam ser empregados em processos biocatalíticos diversos, como na síntese de fármacos, biolubrificantes, biodiesel, ésteres de glicerol e ésteres aromáticos.

## **1.2. Objetivo da Tese**

### **1.2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho objetivou desenvolver novas partículas poliméricas, buscando-se avaliar o uso dessas partículas como suporte para a síntese de biocatalisadores enzimáticos, e estudar o escalonamento do processo de produção.

### **1.2.2. Objetivos Específicos**

O presente trabalho visou, mais especificamente, a aprofundar o estudo de desenvolvimento de novas partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo, adotando-se diferentes estratégias de reação, de forma a sintetizar partículas com áreas específicas e porosidades mais pronunciadas. Buscou-se também avaliar de que forma a composição química das partículas afetava a resistência mecânica de tais materiais. Procurou-se ainda investigar a influência das propriedades morfológicas e químicas dos suportes poliméricos na síntese dos biocatalisadores com atividade lipásica, avaliando-se os diferentes parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização e retenção de atividade. Os biocatalisadores produzidos também foram avaliados quanto

ao seu desempenho em reações de esterificação e hidrólise. Por fim, objetivou-se escalonar o processo de polimerização e estudar a introdução de grupamentos funcionais nas nanopartículas formadoras da casca polimérica, avaliando-se a estratégia de funcionalização mais adequada.

### ***1.3. Estrutura da Tese***

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

No Capítulo II é apresentada uma breve revisão bibliográfica, envolvendo as principais características da polimerização em suspensão e da polimerização em emulsão. São apresentados, com mais detalhe, os principais estudos encontrados na literatura, envolvendo a síntese de partículas com estrutura casca-núcleo e a técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Este capítulo é subdividido em sete seções principais. Na seção 2.2 é mostrada a metodologia experimental adotada na etapa de síntese das partículas casca-núcleo a partir da polimerização em suspensão e emulsão simultâneas em escala bancada. São apresentadas também as técnicas de caracterização das partículas poliméricas, como cromatografia de permeação em gel (GPC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia óptica, calorimetria exploratória diferencial (DSC), de determinação da área específica das partículas, da distribuição de tamanhos das partículas do sobrenadante e da distribuição de tamanhos das partículas empregadas como suporte na imobilização. A metodologia de avaliação da resistência mecânica das partículas produzidas também é mostrada. Os resultados e as conclusões correspondentes a esta etapa em escala bancada são apresentados nas seções 2.3 e 2.4, respectivamente. Na seção 2.5 é apresentada a metodologia experimental utilizada para síntese das partículas casca-núcleo por meio da mesma técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas em escala piloto. Os principais resultados encontrados são apresentados na seção 2.6. Por fim, na seção 2.7, as principais conclusões atingidas nesta etapa do trabalho são descritas.

No Capítulo III são descritas as principais técnicas de imobilização enzimática. Em seguida, são destacados alguns trabalhos recentes que utilizaram partículas poliméricas porosas para a imobilização de lipases, principalmente da CAL-B. São

abordados com mais detalhe os trabalhos presentes na literatura que empregaram as partículas poliméricas com estrutura casca-núcleo, sintetizadas a partir do processo de suspensão e emulsão simultâneas, como suporte para a síntese de biocatalisadores. Em seguida, na seção 3.2, a metodologia experimental utilizada na etapa de imobilização enzimática e as técnicas usadas para determinação dos parâmetros de imobilização e para avaliação das atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores produzidos são descritas. Os resultados correspondentes a esta etapa do trabalho são apresentados nas seções 3.3, enquanto as principais conclusões alcançadas são mostradas na seção 3.4.

No Capítulo IV são descritos alguns trabalhos que envolvem a funcionalização de materiais e partículas poliméricas, com especial destaque para a reação conhecida por *Click Chemistry*. As metodologias e principais resultados encontrados estão subdivididos em três seções. Na Seção 4.2 são apresentadas as metodologias e os principais resultados envolvendo a funcionalização de matrizes poliméricas. Na Seção 4.3 são mostradas as metodologias e os principais resultados envolvendo a síntese e a funcionalização das nanopartículas poliméricas formadoras da casca das partículas casca-núcleo. Por fim, na seção 4.4, são apresentadas as principais conclusões obtidas nesta etapa do trabalho.

No Capítulo V são apresentadas as conclusões finais encontradas ao longo do trabalho e são formuladas algumas questões que ainda não foram respondidas, mas que incentivam a realização de novos trabalhos nessa linha de pesquisa.

No Apêndice A são mostradas as equações envolvidas na análise cinética referente a cada reação de polimerização realizada.

No Apêndice B são apresentadas algumas análises de calorimetria exploratória diferencial das partículas poliméricas sintetizadas, objetivando ilustrar a ausência de temperaturas de transição vítrea para os materiais reticulados produzidos.

No Apêndice C são apresentadas as isotermas de adsorção dos suportes poliméricos produzidos e empregados no processo de imobilização enzimática e as isotermas correspondentes às duas amostras comerciais, Accurel e *Novozym 435*.

No Apêndice D são mostrados os trabalhos publicados nessa linha de pesquisa ao longo do período do doutorado.

## *Capítulo II*

# **Síntese de Suportes Poliméricos**

Este capítulo diz respeito à síntese das partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo, empregadas como suporte na síntese de biocatalisadores. Assim, o objetivo da Seção 2.1 é apresentar uma breve revisão bibliográfica sobre os mecanismos de polimerização em suspensão e emulsão e os diferentes processos empregados atualmente com o objetivo de sintetizar partículas com morfologia casca-núcleo. Os processos conduzidos em suspensão-emulsão simultâneas são descritos com mais detalhe nessa mesma seção. Em seguida, na Seção 2.2, são apresentadas as metodologias e os materiais empregados para a síntese de tais partículas em escala de bancada. Na Seção 2.3 são mostrados os principais resultados encontrados em relação à síntese dos suportes poliméricos. As principais conclusões obtidas nesta primeira etapa do trabalho são apresentadas na Seção 2.4. A segunda etapa do trabalho, que envolve os materiais e as metodologias empregadas para a síntese das partículas poliméricas em escala piloto, é apresentada na Seção 2.5. Na Seção 2.6 são mostrados os resultados relacionados à produção de tais suportes em larga escala. Por fim, as principais conclusões obtidas com base nos resultados discutidos são apresentadas na seção 2.7.

### ***2.1. Revisão Bibliográfica***

#### ***2.1.1. Mecanismos de Processos de Polimerização***

Os processos de polimerização podem ser subdivididos em dois grandes grupos, a depender do mecanismo envolvido na síntese do polímero: polimerização em etapas e polimerização em cadeia. A polimerização em etapas engloba reações entre grupamentos funcionais presentes nos monômeros de interesse. Neste tipo de reação, o tamanho das cadeias poliméricas cresce a uma velocidade relativamente baixa. Na polimerização em cadeia, um iniciador é usado para gerar uma espécie reativa, que pode ser um radical livre, um cátion, um ânion ou um complexo de coordenação. A reação de polimerização ocorre, então, com a propagação da espécie ativa, por meio da adição sequencial de monômeros

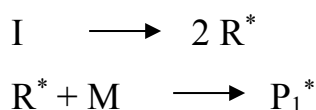


à cadeia. Assim, a partir apenas da reação entre o monômero e a espécie ativa, ocorre o crescimento rápido da cadeia polimérica, gerando polímeros de alta massa molar mesmo no início da reação e a baixas conversões (1- 40 %) (ODIAN, 2004).

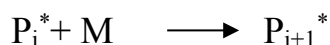
### **2.1.1.1. Polimerização em Cadeia via Radicais Livres**

Nos processos de polimerização estudados no presente trabalho, que engloba reações em suspensão e em emulsão, foram empregados iniciadores que se decompõem termicamente, gerando radicais livres (espécies reativas) no meio reacional. Dessa forma, as etapas reacionais elementares que ocorrem simultaneamente nessas reações de polimerização em cadeia via radicais livres são descritas a seguir. (É importante ressaltar que cada componente é descrito na Seção Nomenclatura, página xxiii).

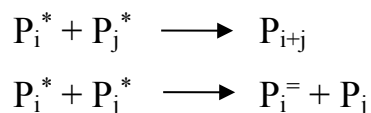
- I) Etapa de iniciação: engloba as reações de iniciação no meio reacional, relacionadas à geração de radicais livres, que são os responsáveis pelo início da reação de polimerização (KIPARISSIDES, 1996).



- II) Etapa de propagação: envolve o crescimento das cadeias poliméricas, por meio da adição sequencial de moléculas de monômero ao centro ativo da cadeia em crescimento (KIPARISSIDES, 1996).



- III) Etapa de terminação: a partir de reações entre dois centros radicalares, ocorre o término do crescimento da cadeia (KIPARISSIDES, 1996). Há dois tipos fundamentais de reações de terminação: a etapa de terminação por combinação, em que os dois centros radicalares em crescimento se combinam, gerando uma cadeia saturada; e a etapa de terminação por desproporcionamento, em que um átomo de hidrogênio de uma espécie é transferido para a outra espécie, resultando na geração de uma espécie insaturada e de outra espécie saturada (ODIAN, 2004).



Vale salientar que, a depender das espécies presentes no meio reacional, outras reações podem ocorrer, como reações de transferência de cadeia, reações de reticulação e reações de copolimerização (caso outra espécie monomérica esteja presente no meio) (ODIAN, 2004; PINTO *et al.*, 2013).

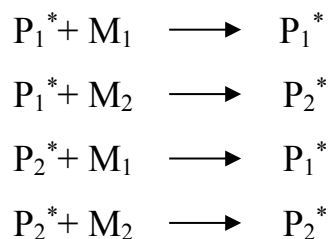
### **2.1.1.2. Copolimerização em Cadeia via Radicais Livres**

A versatilidade das reações de polimerização não envolve apenas os diferentes processos que podem ser realizados, mas também os diferentes tipos de reagentes que podem ser empregados e a possibilidade de combinar inúmeros componentes em reações de copolimerização, resultando em materiais com propriedades particulares (ODIAN, 2004; PINTO *et al.*, 2013).

A reação de copolimerização é caracterizada por envolver duas espécies monoméricas distintas, apresentando o copolímero pelo menos duas unidades de repetição ( $R_1$  e  $R_2$ ). Esse tipo de reação permite modificar quimicamente a estrutura polimérica e, inclusive, introduzir grupamentos funcionais no polímero produzido. Dessa forma, as propriedades de determinado homopolímero podem ser modificadas com um determinado propósito a partir da introdução de uma segunda unidade monomérica (ODIAN, 2004).

Nas reações de copolimerização em cadeia, a taxa de reação dos monômeros difere das taxas encontradas em homopolimerizações, podendo apresentar uma maior reatividade ou serem menos reativos. Além disso, as reatividades não são necessariamente semelhantes para os diferentes comonômeros. Assim, a determinação da composição dos diferentes copolímeros e também do mecanismo cinético de cada copolimerização não constituem processos triviais, como pode ser percebido por meio da análise das etapas reacionais elementares, que ocorrem simultaneamente nas reações de copolimerização em cadeia via radicais livres, mostradas a seguir. Vale ressaltar que, para descrever tais etapas, considerou-se que as reatividades das espécies propagantes são funções apenas da unidade métrica que encerra a cadeia do polímero em crescimento, de

acordo com o bem conhecido modelo último ou terminal (ODIAN, 2004; PINTO *et al.*, 2013).



É importante mencionar que, durante o presente trabalho, diferentes copolimerizações foram realizadas com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas das partículas produzidas e adicionar grupamentos funcionais às nanopartículas formadoras da casca polimérica dos suportes.

### **2.1.2. Processos de Polimerização**

Em geral, os processos de polimerização podem ser classificados como processos homogêneos e processos heterogêneos. Os processos homogêneos englobam reações conduzidas em uma única fase, como as polimerizações em massa ou em solução. Já os processos heterogêneos envolvem a presença de ao menos duas fases. Nesta categoria, encontram-se inúmeros processos, como a polimerização em suspensão, em emulsão, dentre outras. No entanto, alguns processos homogêneos podem se tornar heterogêneos, em função da insolubilidade do polímero no meio reacional, como por exemplo nas polimerizações por precipitação (ARSHADY, 1992; KIPARISSIDES, 1996; ODIAN, 2004).

Os processos heterogêneos originam partículas com diferentes propriedades, podendo apresentar morfologia esférica ou irregular, com diâmetro médio que pode variar de 50 nm a 1 - 2 mm (ARSHADY, 1992). Assim, tais resinas podem ser empregadas para os mais diferentes fins, incluindo aplicações nas áreas médica, odontológica, de construção civil e de bioprocessos (SANTOS, 2007; PEIXOTO *et al.*, 2009; BESTETI, 2011). Vale salientar que alguns dos processos mencionados podem ainda ser combinados, mediante alguns ajustes, resultando em partículas com propriedades diferenciadas (ARSHADY, 1992; LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003).

No presente trabalho, os suportes enzimáticos foram produzidos a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Dessa forma, esses dois processos são descritos de forma mais detalhada a seguir.

### ***2.1.3. Processo de Polimerização em Suspensão***

Os processos de polimerização em suspensão são indicados para a produção de partículas esféricas em escala micrométrica. Os produtos resultantes deste tipo de processo apresentam enorme aplicabilidade em processamentos por extrusão e moldagem, além de amplo uso na área médica e de bioprocessos. Dessa forma, muitas resinas comerciais são sintetizadas a partir do processo de polimerização em suspensão, como poli(metacrilato de metila) e copolímeros, poliestireno e copolímeros, poli(cloreto de vinila) e copolímeros e poli(acetato de vinila) e copolímeros (YUAN *et al.*, 1991; VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; PINTO *et al.*, 2013).

A polimerização em suspensão clássica envolve a dispersão de um ou mais monômeros orgânicos em um meio aquoso, na presença de um iniciador solúvel na fase orgânica. Dessa forma, por intermédio de agitação vigorosa e adição de estabilizantes (agentes de suspensão) no meio reacional, a fase orgânica é dispersa na fase contínua (YUAN *et al.*, 1991; ARSHADY, 1992; VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; MACHADO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2013). As reações de polimerização em suspensão, quando conduzidas sob pressão atmosférica, são realizadas geralmente em uma faixa de temperatura entre 40 e 90 °C (KALFAS *et al.*, 1993). Assim, ao longo da reação, as gotas monoméricas formadas inicialmente são convertidas progressivamente em partículas de alta viscosidade. São produzidas ao final do processo partículas poliméricas esféricas. Em função do caráter compartimentado das gotículas, considera-se que a polimerização em suspensão ocorra como um conjunto de micro-reatores, em que cada gota monomérica funciona como um reator de polimerização em massa (ARSHADY, 1992; MACHADO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2013).

Algumas desvantagens do processo de polimerização em suspensão estão associadas a problemas de incrustação do material polimérico nas paredes do reator e suas partes internas, o que dificulta a implantação de reatores comerciais que operem de modo contínuo. Outro problema está associado à ineficiente taxa de transferência de monômero para o interior das gotas, quando o monômero é alimentado na forma de uma operação

em semi-batelada a um sistema já em operação, o que dificulta as operações industriais conduzidas em modo semi-batelada. Além disso, as taxas de reação e as massas molares médias obtidas são, em geral, mais baixas que as encontradas em processos de polimerização em emulsão clássicos. Ademais, a adição de água provoca a diminuição da produtividade, quando comparada a de um reator de mesma capacidade em que se conduz a polimerização em massa (YUAN *et al.*, 1991; PINTO *et al.*, 2013).

Contudo, é importante salientar que o processo de polimerização em suspensão reúne também diversas vantagens, quando comparado aos demais processos de polimerização (massa, solução e emulsão). Por exemplo, as taxas de reação são maiores, quando comparadas às da polimerização em solução, por conta do aumento relativo da concentração de monômero em cada gotícula. Como as partículas são relativamente grandes (tipicamente 5 – 1000  $\mu\text{m}$ ), elas podem ser separadas do meio reacional ao final da reação apenas por sedimentação, sem necessidade da adição de agentes coagulantes, o que diminui os níveis de impureza no produto final e os custos para separação da resina, quando comparada à polimerização em emulsão. Além disso, a baixa viscosidade do meio reacional, mesmo a altas conversões, possibilita a obtenção de suspensões homogêneas e permite maior facilidade para operar o sistema, sendo mais eficaz o controle e a remoção de calor ao longo da reação (quando comparada às polimerizações em solução e massa). Adicionalmente, em função da obtenção, ao final do processo, de partículas esféricas relativamente homogêneas em tamanho e forma, essas resinas apresentam enorme aplicabilidade na área médica e na síntese de colunas cromatográficas. É sabido também que a distribuição de tamanhos de partícula pode ser alterada a partir da manipulação adequada da velocidade de agitação do impelidor e da quantidade de agente de suspensão adicionada ao sistema (YUAN *et al.*, 1991; MACHADO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2013).

### Componentes da Polimerização em Suspensão

Para condução de uma reação de polimerização em suspensão, é preciso destacar a ação de dois componentes: o iniciador e o agente de suspensão. Os iniciadores, como mencionado anteriormente, são responsáveis pelo início da reação de polimerização. São compostos geralmente solúveis na fase orgânica monomérica, onde ocorre a polimerização, sendo na maioria das vezes ativados termicamente. Os iniciadores geralmente empregados são peróxidos orgânicos (peróxido de benzoíla - BPO, por

exemplo) e azocompostos (como a azobisisobutironitrila - AIBN). Em geral, o teor de iniciador em uma reação encontra-se na faixa de (0,1 - 0,5) % em relação à massa de monômero empregada na polimerização (KALFAS *et al.*, 1993; VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; DOWDING e VINCENT, 2000; PINTO *et al.*, 2013).

Os agentes de suspensão ou estabilizantes são, em geral, polímeros solúveis em fase aquosa que apresentam caráter hidrofóbico e hidrofílico; compostos inorgânicos que não apresentam solubilidade em nenhuma das duas fases, concentrando-se na interface óleo/água; ou ainda surfactantes adicionados em baixas concentrações. Esses componentes facilitam a estabilidade das gotas de monômero ao longo da polimerização, pois provocam a diminuição da tensão interfacial entre a fase monomérica e a fase aquosa (DOWDING e VINCENT, 2000; JAHANZAD *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2013). Além disso, eles também dificultam a aglomeração de partículas parcialmente polimerizadas ao longo da reação, principalmente na fase em que apresentam caráter pegajoso, em função da formação de uma espécie de filme protetor ao redor das partículas (KALFAS *et al.*, 1993; VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; PINTO *et al.*, 2013).

É possível citar inúmeros agentes de suspensão empregados em reações de polimerização em suspensão, destacando-se a polivinilpirrolidona, o carbonato de cálcio, o sulfato de bário, dentre outros (DOWDING e VINCENT, 2000). Um dos agentes de suspensão mais empregados em reações de polimerização em suspensão é o poli(álcool vinílico) - PVA, obtido a partir da hidrólise parcial do poli(acetato de vinila) (JAHANZAD *et al.*, 2005). É importante mencionar que o grau de hidrólise do PVA e sua massa molar afetam diretamente a estabilidade e a morfologia final as partículas produzidas. Dessa forma, as especificações mais recomendadas para o PVA a ser utilizado como estabilizante em reações em suspensão englobam grau de hidrólise entre 80 – 90 % e massa molar acima de 70.000 Da (MENDIZABAL *et al.*, 1992; JAHANZAD *et al.*, 2005).

### Distribuição de Tamanhos de Partícula

Vale ressaltar que as propriedades e a aplicação final das resinas produzidas dependem da distribuição de tamanhos de partícula do produto sintetizado ao final da reação. É sabido que a distribuição de tamanhos das gotas monoméricas e, conseqüentemente, a distribuição de tamanhos das partículas poliméricas formadas são

resultado dos fenômenos de quebra e coalescência das gotas de monômero ao longo da reação (YUAN *et al.*, 1991; KALFAS *et al.*, 1993; DOWDING e VINCENT, 2000). Assim, é importante apresentar alguns fatores que afetam diretamente esse mecanismo: o tipo de monômero empregado; a velocidade de agitação imposta ao sistema; a geometria e o tamanho do reator; o tipo e as dimensões do impelidor, em relação ao tamanho do reator; presença ou ausência de chicanas; a viscosidade das fases contínua e dispersa presentes no meio; a concentração e o tipo de agente de suspensão empregado (VIVALDO-LIMA *et al.*, 1997; DOWDING e VICENT, 2000; JAHANZAD *et al.*, 2005).

### Tipos de Processo de Polimerização em Suspensão

Mesmo especificando-se o processo polimérico como um processo em suspensão, é importante salientar que a forma como esse processo de polimerização é conduzido pode afetar de forma significativa o comportamento cinético, a morfologia e a homogeneidade das partículas produzidas. Dessa forma, é possível destacar, além da polimerização tipo pérola (detalhada a seguir), outros tipos de processos em suspensão: polimerização tipo granular (o polímero é insolúvel no seu monômero, havendo a precipitação das cadeias poliméricas no interior de cada gota); polimerização em massa-suspensão ou semi-suspensão (inicialmente ocorre uma polimerização em massa, até que uma determinada conversão seja atingida; a partir desse momento, a massa polimérica é transferida para outro reator, onde é conduzida uma reação em suspensão); polimerização inversa (o monômero hidrofílico é disperso em uma fase contínua orgânica); polimerização em micro-suspensão (uma agitação vigorosa é imposta ao sistema, juntamente com a adição de agentes estabilizantes, gerando partículas poliméricas muito pequenas) (YUAN *et al.*, 1991; DOWDING e VINCENT, 2000; MACHADO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2013).

#### Polimerização Tipo Pérola

A polimerização do tipo pérola ou polimerização clássica, como também é conhecida, é o tipo de polimerização realizado no presente trabalho. Neste sistema de polimerização, a distribuição de tamanhos de partícula é extremamente dependente da distribuição de tamanho das gotas monoméricas e do controle dos fenômenos de

coalescência nos primeiros estágios da reação. Neste tipo de polimerização, o monômero atua como solvente do polímero produzido. Inicialmente, o sistema comporta-se como uma suspensão de um líquido em outro líquido. Ao longo da reação, ocorre o aumento expressivo na viscosidade da fase dispersa e as partículas tornam-se pegajosas. Dessa forma, em função do caráter pegajoso de tais partículas, o controle para evitar a aglomeração torna-se crítico. Caso a suspensão seja instável, ocorre a coalescência generalizada das partículas, havendo a formação de uma massa polimérica disforme. Contudo, caso a suspensão seja estável, o fenômeno de coalescência é interrompido, sendo obtidas partículas esféricas, rígidas e muito pouco porosas. Assim, o limite que divide as duas últimas transições é frequentemente chamado de ponto de identificação da partícula, a partir do qual não é mais possível controlar a distribuição de tamanhos das partículas (YUAN *et al.*, 1991; MACHADO *et al.*, 2007; PINTO *et al.*, 2013).

#### **2.1.4. Processos de Polimerização em Emulsão**

A polimerização em emulsão clássica envolve uma fase monomérica, constituída por um ou mais monômeros, e uma fase contínua aquosa, que contém um surfactante (ou agente emulsificante) e um iniciador, solúvel na fase aquosa (ARSHADY, 1992; WANG *et al.*, 1994; ODIAN, 2004). Vale ressaltar que outros componentes também podem ser adicionados ao meio reacional, objetivando aumentar a estabilidade do látex. Muitas vezes, bicarbonato de sódio é adicionado à reação com esta finalidade, de forma a corrigir possíveis variações de pH ao longo da polimerização (ODIAN, 2004). A reação de polimerização em emulsão é usualmente conduzida em uma faixa de temperatura entre 40 e 80 °C (ARSHADY, 1992). Ao final da reação são obtidas partículas em escala submicrométrica, geralmente na faixa entre 50 e 300 nm, que permanecem suspensas no sobrenadante, formando o chamado látex (ARSHADY, 1992; QIU *et al.*, 2001).

Os polímeros produzidos a partir desse processo são empregados em diferentes aplicações, como na área de adesivos, tintas, borrachas e recobrimentos. Além disso, esses materiais vêm sendo empregados em colunas cromatográficas e na síntese de partículas para uso em aplicações de liberação controlada de fármacos (WANG *et al.*, 1994). Diante disso, diversos polímeros são produzidos em escala comercial por meio da polimerização em emulsão, como poli(acetato de vinila), policloroprenos, diversos poliacrilatos, copolimerizações de estireno, butadieno e acrilonitrila (ODIAN, 2004). Vale ressaltar



que, além dos processos em batelada, outros processos de polimerização em emulsão podem ser conduzidos de forma satisfatória, como processos em semi-batelada e contínuos (QIU *et al.*, 2001).

A polimerização em emulsão difere da polimerização em suspensão quanto a diferentes aspectos: à cinética de polimerização; aos componentes adicionados ao sistema de polimerização; à massa molar das cadeias poliméricas obtidas; aos mecanismos de formação de partículas; ao tamanho das partículas produzidas ao final do processo; e aos mecanismos de transferência de massa que envolvem as diferentes espécies presentes no meio reacional (ARSHADY, 1992; ODIAN, 2004).

Quando comparada aos demais processos de polimerização, a polimerização em emulsão apresenta algumas vantagens. Como o sistema permanece fluido ao longo de toda a polimerização, a dissipação de calor durante a reação é facilitada. A massa molar das cadeias poliméricas é frequentemente mais elevada que as obtidas em processos de polimerização em massa e em solução. Muitas vezes o próprio látex obtido é empregado diretamente, sem haver a necessidade de etapas de separação. A massa molar dos polímeros formados é facilmente controlada a partir da adição de agentes de transferência de cadeia. O processo em emulsão é o único no qual é possível aumentar a massa molar das cadeias poliméricas sem reduzir a taxa de polimerização, enquanto nos outros processos há na maioria das vezes uma relação inversa entre taxa de polimerização e a massa molar. Os problemas viscosos e térmicos são muito menores do que os apresentados em reações em massa (WANG *et al.*, 1994; ODIAN, 2004). Contudo, o processo em emulsão também apresenta algumas desvantagens: em função da adição de surfactantes e, algumas vezes, de coagulantes, há dificuldade para remoção desses componentes das partículas produzidas ao final do processo, resultando na exclusão muitas vezes desses polímeros de aplicações que demandam grande pureza. Além disso, em função da necessidade da presença de uma fase dispersante, o volume efetivo disponível para reação é reduzido, quando comparado com a polimerização em massa (WANG *et al.*, 1994).

Os mecanismos e fenômenos envolvidos no processo de polimerização em emulsão são muitos e são complexos. Inúmeros estudos começaram a ser realizados por HARKINS (1945a, 1945b, 1947), com o objetivo de explicar tais fenômenos. As principais hipóteses apresentadas foram: as partículas poliméricas são formadas principalmente no interior das micelas, que são agregados de emulsificante, inchadas com

monômero; os radicais livres, gerados a partir da decomposição do iniciador na fase aquosa, se direcionam até as micelas, iniciando a reação de polimerização e a formação das partículas poliméricas; a gota monomérica funciona principalmente como um reservatório de monômero e de surfactante, que alimentam as micelas e partículas poliméricas formadas à medida que a reação avança; o crescimento das partículas ocorre até a entrada de um segundo radical, havendo a terminação da cadeia polimérica, embora a entrada de outro radical provoque formação e crescimento de nova cadeia; a presença de excesso de emulsificantes no meio provoca não só a formação de micelas, mas também promove a estabilização das gotas de monômero e das partículas poliméricas formadas; o aumento da quantidade de emulsificante no meio reacional provoca o aumento no número de partículas poliméricas e também a redução do diâmetro de tais partículas (LENZI, 2002).

A partir das hipóteses desenvolvidas por HARKINS (1945a, 1945b, 1947) e de muitas pesquisas realizadas posteriormente, conveniou-se subdividir o processo da polimerização em emulsão em três etapas principais, descritas a seguir (WANG *et al.*, 1994; LENZI, 2002; ODIAN, 2004).

- I. Na etapa inicial, há a nucleação das micelas (nucleação micelar ou heterogênea) e o início da formação das partículas poliméricas. Os iniciadores presentes no meio aquoso são decompostos, gerando radicais livres, que iniciam a reação de polimerização, promovendo o aumento do número de partículas. O sistema é caracterizado pela presença de micelas e gotas monoméricas, havendo o aumento do número e do tamanho das partículas poliméricas. Esse estágio corresponde a uma conversão na faixa de (0 - 10) %. A captura dos radicais formados na fase aquosa pelas micelas é devido à elevada área específica das micelas, que apresentam diâmetro característico na faixa de 1 – 5 nm.
  
- II. A segunda etapa se inicia quando a nucleação das micelas se encerra. É caracterizada, então, pela ausência de micelas, por um número constante de partículas poliméricas inchadas com monômeros e pelo crescimento de tais partículas. A conversão neste estágio encontra-se na faixa entre (10 - 40) %.

- III. A terceira e última etapa começa com o desaparecimento das gotas de monômero, quando praticamente todo o monômero remanescente está aprisionado no interior das partículas poliméricas inchadas. Essa etapa é caracterizada pelo número constante de partículas e pela queda na concentração de monômero nas partículas. Esta fase corresponde a conversões entre (40 - 100) %.

Alguns mecanismos são descritos mais usualmente na literatura para explicar a síntese das partículas poliméricas em emulsão. São destacados a seguir quatro desses mecanismos, considerando o iniciador solúvel em meio aquoso: (1) os radicais livres, presentes na fase aquosa, entram nas micelas inchadas com monômero, iniciando a polimerização (nucleação micelar); (2) os radicais livres presentes na fase aquosa reagem com as moléculas de monômero dissolvidas no meio contínuo, havendo o crescimento da cadeia polimérica, até que o limite de solubilidade é atingido, ocorrendo a precipitação do polímero e a formação de novas partículas (nucleação homogênea); (3) os radicais presentes no meio aquoso entram na gota de monômero, iniciando a polimerização nas gotas (nucleação na gota); (4) as partículas geradas, por apresentarem muitas vezes um caráter coloidal instável, coagulam, resultando em partículas mais estáveis (nucleação coagulativa) (WANG *et al.*, 1994).

Alguns estudos sustentam a hipótese de que a nucleação preponderante no processo de polimerização em emulsão é a nucleação homogênea, teoria conhecida como HUFT (Hansen-Ugelstad-Fitch-Tsai) (UGELSTAD E HANSEN, 1976; WANG *et al.*, 1994). Uma extensão da teoria HUFT considera o mecanismo de nucleação coagulativa como relevante para a formação das partículas poliméricas. Logo, o mecanismo exato envolvido na formação de partículas poliméricas nas reações de polimerização em emulsão ainda não é completamente consensual (WANG *et al.*, 1994). A maior ou menor ocorrência das nucleações micelar ou homogênea depende da solubilidade do monômero empregado e da concentração de surfactante no meio reacional (ODIAN, 2004).

Vale ressaltar, contudo, que a área específica das micelas é muito superior à área das gotas monoméricas, de maneira que a probabilidade de um radical ser capturado por uma gota de monômero é muito baixa. Dessa forma, as partículas são formadas principalmente por nucleações homogêneas e micelares, excluindo a polimerização da

gota, a não ser que as gotas sejam muito pequenas e não haja excesso de emulsificante (processos em miniemulsão) (ASUA, 2002).

### *Componentes do Processo de Polimerização em Emulsão*

Os iniciadores empregados no processo de polimerização em emulsão clássica são solúveis na fase aquosa. Os iniciadores tipicamente utilizados são persulfato de amônio, persulfato de potássio e peróxido de hidrogênio (ARSHADY, 1992; ODIAN, 2004). Peróxidos parcialmente solúveis em água, como peróxido de ácido succínico, também são empregados. Os radicais gerados em meio aquoso podem se direcionar para as micelas; contudo, em função do seu caráter hidrofílico, é mais comum que reajam com moléculas de monômeros dissolvidas no meio aquoso, gerando oligorradicais que, então, difundem para as micelas e para as partículas poliméricas (ODIAN, 2004).

Os surfactantes ou emulsificantes são moléculas anfífilicas que apresentam uma parte apolar e uma parte polar. A adição de surfactantes no meio reacional provoca uma diminuição da tensão interfacial entre as fases aquosa e monomérica, ocorrendo o aumento da estabilidade das gotas de monômeros. Além disso, em função da presença de grupamentos polares ou iônicos, os emulsificantes também provocam o aumento da estabilidade do látex, evitando a aglomeração de partículas. Caso a adição de surfactante esteja acima da CMC (concentração micelar crítica), ocorre a formação de aglomerados organizados (micelas) na fase contínua, estando a região hidrofóbica das moléculas de surfactante concentradas no interior do agregado e a parte mais hidrofílica, cauda iônica ou polar, em contato com o meio aquoso. Dessa forma, o aumento na adição de surfactante para valores acima da CMC não é acompanhado pela queda pronunciada da tensão interfacial (ODIAN, 2004). Nos processos em emulsão, os surfactantes aniônicos (como dodecilbenzeno sulfonato de sódio e lauril sulfato de sódio, SDS) são mais comumente empregados, em função do mais baixo custo e da boa eficiência de estabilização (SHAW, 1992; ODIAN, 2004).

No presente trabalho, a concentração micelar crítica do dodecil sulfato de sódio, surfactante empregado em todos os experimentos, em água a 40 °C é 0,0086 mol.dm<sup>-3</sup> (SHAW, 1992). Assim, é possível perceber que as concentrações de emulsificante empregadas em todas as reações encontram-se acima da CMC.

### Distribuição de Tamanhos de Partículas

A distribuição de tamanhos das partículas poliméricas em uma emulsão também afeta diretamente a aplicação final do produto. Dessa forma, é importante determinar que parâmetros afetam a distribuição de tamanhos neste tipo de reação.

Na polimerização em emulsão, não há uma correspondência direta entre o tamanho inicial das gotas monoméricas, formadas no início da reação, ou das micelas com o tamanho final das partículas produzidas. Sabe-se, contudo, que há uma dependência entre o tamanho das partículas produzidas e a taxa de nucleação. Dessa forma, alguns fatores que afetam a distribuição de tamanhos de partícula neste tipo de processo são: a fração de monômero solúvel na fase dispersa; a concentração de emulsificante; a temperatura da reação de polimerização. Outros fatores que afetam a taxa de polimerização e também provocam mudanças no tamanho das partículas produzidas envolvem a concentração de iniciador e de sal presentes no meio. A concentração de sal, por exemplo, afeta a viscosidade do meio e também sua força iônica; ambos afetam o mecanismo de nucleação (ARSHADY, 1992). Vale salientar que o tamanho das partículas também pode depender do grau de agitação imposto ao sistema (GRAILLAT *et al.*, 1986). Dessa forma geral, quanto maiores as quantidades de surfactante (e de micelas), maior é o número de partículas formadas e menor o diâmetro médio final das partículas.

### Tipos de Processo de Polimerização em emulsão

A polimerização em emulsão engloba alguns sistemas que apresentam características distintas do processo em emulsão clássico. É possível destacar ao menos cinco tipos diferentes de processos de polimerização em emulsão: (i) polimerização em microemulsão (semelhante à emulsão clássica, mas com gotas monoméricas menores, em função da concentração mais alta de emulsificante (RAO e GECKELER, 2011)); (ii) polimerização em emulsão livre de emulsificante (a polimerização em emulsão é conduzida na ausência de emulsificante, sendo empregados iniciadores inonizáveis ou comonômeros iônicos, que formam os estabilizantes *in situ* (WANG *et al.*, 1994; RAO e GECKELER, 2011)); (iii) polimerização em emulsão inversa (nesse tipo de reação, um monômero hidrofílico é disperso em um meio orgânico, sendo empregados iniciadores

solúveis na fase orgânica e geralmente surfactantes não iônicos (ODIAN, 2004)). As técnicas de polimerização mais empregadas atualmente para a síntese de nanopartículas são as polimerizações em emulsão, em miniemulsão e em microemulsão (RAO e GECKELER, 2011). A seguir, será descrita brevemente a polimerização em emulsão clássica (já discutida ao longo desta seção), enquanto a polimerização em miniemulsão será detalhada adiante.

#### Polimerização em emulsão clássica

A polimerização em emulsão clássica é a técnica mais utilizada de polimerização em emulsão (RAO e GECKELER, 2011). Os componentes principais deste processo são: o monômero, insolúvel em água; um meio dispersante, geralmente água; emulsificante e iniciador, solúvel na fase aquosa. A razão mássica entre as fases monomérica e dispersa (monômero/água) varia em torno de (30/70) a (40/60). O sistema em emulsão é mantido sob agitação vigorosa ao longo de toda a reação (ODIAN, 2004). O diâmetro médio das partículas produzidas encontra-se na faixa entre 50 e 300 nm (QIU *et al.*, 2001).

#### Polimerização em miniemulsão

O processo de polimerização em miniemulsão envolve a presença dos componentes típicos da polimerização em emulsão (surfactante, iniciador, fase monomérica e fase dispersa aquosa) e de co-estabilizantes. Iniciadores solúveis tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa são empregados, gerando látex estáveis. Além disso, altas tensões de cisalhamento são impostas ao sistema, por meio da utilização de sonicadores, homogeneizadores de alta pressão ou misturadores de alta pressão (Turrax) (QIU *et al.*, 2001; ASUA, 2002; RAO e GECKELER, 2011). O objetivo deste tipo de processo é aumentar a área das gotas de monômero formadas durante a dispersão da fase monomérica, favorecendo o processo de nucleação no interior de cada gota de monômero, e não no interior da micela, de maneira que cada gota atua como um nanorreator. Assim, em relação à polimerização em emulsão clássica, esse processo de polimerização é mais simples. A estabilidade das gotas é favorecida por meio da adição de co-estabilizantes ao sistema, como álcoois de cadeia longa (como álcool cetílico) e compostos hidrofóbicos (como hexadecano). A função dos álcoois de cadeia longa é criar uma barreira ao redor das gotas juntamente com os surfactantes. Além disso, objetiva-se criar uma pressão osmótica no interior das gotas, evitando a difusão de monômero das gotas menores para

as maiores (mecanismo de *Ostwald Ripening*<sup>1</sup>), mesmo mecanismo de ação dos co-estabilizantes hidrofóbicos (QIU *et al.*, 2001). Diversos estudos estão sendo realizados nesta área, incluindo a síntese de poliestireno, poli(metacrilato de metila), poli(acetato de vinila) e inúmeras copolimerizações (QIU *et al.*, 2001; ASUA, 2002). O tamanho das partículas geralmente encontra-se na faixa entre 30 e 200 nm (QIU *et al.*, 2001).

### ***2.1.5 Processos de Síntese de Partículas Poliméricas com Estrutura Casca-Núcleo***

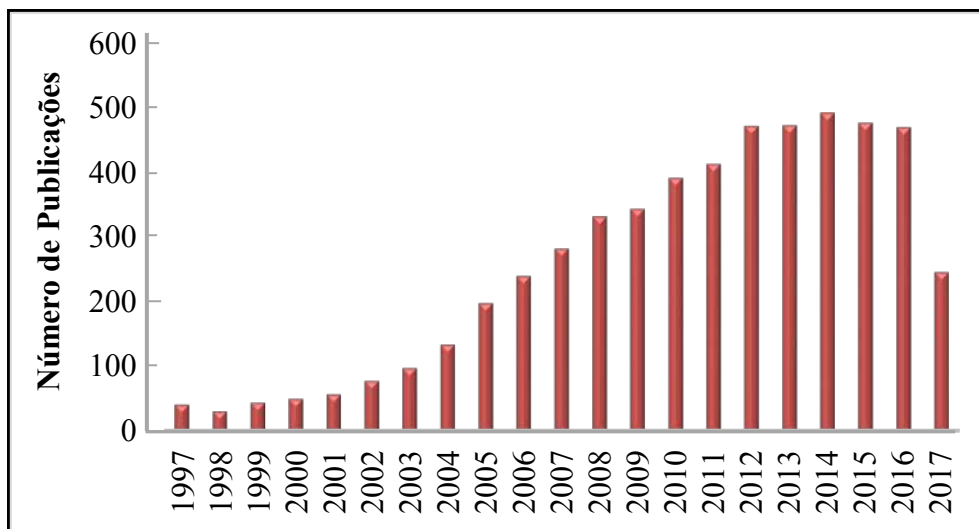
Com o avanço da tecnologia, um número cada vez maior de propriedades de desempenho vem sendo requerido de um polímero. Felizmente, esse avanço tem sido acompanhado pelo desenvolvimento de diferentes processos de polimerização e de diferentes técnicas de processamento, capazes de alterar significativamente as propriedades do material polimérico final. Algumas técnicas amplamente discutidas na literatura englobam, por exemplo, o desenvolvimento de blendas, compósitos, adição de plastificantes e reações de copolimerização. Nesse contexto, destaca-se também a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo.

Para a produção de partículas com estrutura casca-núcleo, é necessário que uma casca seja formada ao redor de um núcleo, sendo ambas as estruturas compostas ou não por materiais poliméricos, e que ambos os materiais sejam distintos quimicamente ou morfologicamente (STUTMAN *et al.*, 1985). Além disso, os componentes do núcleo e da casca não devem difundir-se um no outro, de forma que as estruturas devem ser total ou parcialmente imiscíveis. Especificamente na área dos materiais poliméricos, o processo de formação dessas partículas envolve a ligação de cadeias poliméricas a núcleos pré-formados (também chamados de sementes) ou a difusão de monômeros para o interior dessas sementes (ARSHADY, 1992). O crescente interesse relacionado à síntese de partículas com morfologia casca-núcleo pode ser observado na Figura 1, obtida por meio do site *Web of Knowledge* (empregando-se como palavras-chave *polymerization* e *core-shell*).

---

<sup>1</sup> O mecanismo de *Ostwald Ripening* é o que explica a transferência de massa das pequenas gotas para as gotas maiores por causa da energia acumulada na interface formada entre as fases orgânica e aquosa, maior na gotas maiores.

Pode-se observar que o número de trabalhos da literatura relacionados ao tema praticamente dobrou nos últimos dez anos (quando se compararam os dados de 2016 com os dados encontrados em 2006).



**Figura 1.** Trabalhos publicados na literatura científica, de acordo com a base de dados *Web of Knowledge* (2017), relacionados às palavras-chave *polymerization* e *core-shell*.

As diversas características das partículas casca-núcleo e as possíveis propriedades peculiares da superfície possibilitam empregá-las em diferentes aplicações: na área de produção de plásticos, como modificadores de impacto; na síntese de filmes; na produção de adesivos e tintas; na área de espumas, para fabricação de materiais para isolamento térmico; na área médica e de bioprocessos, como suportes enzimáticos ou agentes de embolização vascular (WINNIK E ZHAO, 1993; LI e STÖVER, 2000; PEIXOTO *et al.*, 2006; GONÇALVES *et al.*, 2009; BESTETI, 2011; PEIXOTO *et al.*, 2011; REDDY *et al.*, 2011). Além disso, tais materiais podem ser porosos e apresentarem áreas específicas pronunciadas, aumentando ainda mais o espectro de aplicações das partículas casca-núcleo (LENZI, 2002; BESTETI 2009; BESTETI, 2011).

Há diferentes processos que possibilitam a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, como as polimerizações em suspensão, emulsão, dispersão, sendo possível também haver a combinação dessas técnicas (OKUBO *et al.*, 1997; OKUBO *et al.*, 1999; LI e STÖVER, 2000; FERGUSON *et al.*, 2002; LENZI, 2002; GU *et al.*, 2005). Vale ressaltar que os processos podem ainda ser conduzidos em batelada ou batelada



alimentada (STUTMAN *et al.*, 1985; LI e STÖVER, 2000). Cada um dos principais processos encontrados na literatura científica será descrito com mais detalhe a seguir.

I) Polimerização em emulsão com o emprego de sementes

A polimerização em emulsão em dois estágios com o emprego de sementes foi o primeiro método desenvolvido para a síntese de partículas de látex com morfologia casca-núcleo. O primeiro estágio envolve a produção das sementes, por meio da polimerização em emulsão. As sementes podem, então, ser tratadas e alimentadas a outro processo de polimerização, ou o segundo estágio da reação pode ser iniciado quando a conversão das sementes atinge um determinado valor. O segundo estágio geralmente pode ser conduzido em batelada alimentada ou em batelada, havendo o recobrimento das sementes pré-produzidas e a formação da casca polimérica (LI e STÖVER, 2000). Há dois mecanismos envolvidos na geração dessa casca polimérica: ou as sementes podem ficar inchadas pelo monômero adicionado no segundo estágio, havendo a posterior polimerização do monômero e a formação de uma casca na periferia das sementes; ou ocorre a formação de partículas poliméricas no segundo estágio da reação e tais partículas passam a se agregar e aglomerar ao redor dos núcleos das sementes, também gerando uma casca polimérica (WINNIK e ZHAO, 1993).

McKENZIE *et al.* (2017) estudaram a síntese de partículas casca-núcleo com propriedades de hidrogel, com núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) e casca de um polímero reticulado de metacrilato de glicerol. As sementes foram produzidas por polimerização em emulsão e a casca foi formada *in situ* a partir da adição dos comonômeros ao meio reacional (1,3 – dioxolano de metacrilato de glicerol e dimetacrilato de etanodiol). Reações sequenciais também foram conduzidas com o objetivo de adicionar novos grupamentos funcionais à superfície das partículas. As nanopartículas (100 – 130 nm) foram empregadas para adsorção de diferentes proteínas. Reação similar foi conduzida por TANG *et al.* (2016), sendo produzidas partículas com núcleo à base de resina epóxi e a casca formada por um filme polimérico de um copolímero de metacrilato de metila, acrilato de butila e ácido acrílico. Percebeu-se que as reações de reticulação entre os polímeros do núcleo e da casca resultavam em materiais com melhores propriedades dínamo-mecânicas.

STUTMAN *et al.* (1985) sintetizaram partículas com morfologia casca-núcleo apresentando núcleo de poli(acrilato de butila) e casca de poliestireno. Inicialmente foram

produzidas as partículas do núcleo, que, após serem tratadas, foram alimentadas a outro processo de polimerização em emulsão. A partir do estudo realizado, percebeu-se que, a depender do valor de algumas variáveis operacionais, partículas com morfologias distintas eram obtidas.

WINNIK e ZHAO (1993) também estudaram a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo por meio do processo em emulsão com o emprego de sementes. Inicialmente foram produzidos núcleos de poliestireno e poli(metacrilato de metila) que, em seguida, foram empregados em outro processo de polimerização, havendo a formação de uma casca polimérica de poli(metacrilato de metila) ou de poliestireno, a depender da reação. Assim, ao final do processo, foram obtidas nanopartículas cujos diâmetros encontravam-se na faixa de 200 a 300 nm.

Outro grupo empregou o mesmo processo, buscando avaliar a formação de partículas secundárias nesses sistemas e compreender de que forma o tamanho das sementes afetava o recobrimento. Para isso, FERGUSON *et al.* (2002) produziram partículas casca-núcleo de poli(acetato de vinila) e poliestireno. Primeiramente, foi feita a síntese das partículas de poliestireno, que foram empregadas como semente na polimerização em emulsão do acetato de vinila. Percebeu-se, então, que quanto menor era o tamanho das sementes, menor era a chance de formação de partículas secundárias.

É importante destacar que o emprego de técnicas de polimerização com o uso de sementes requer o controle das nucleações secundárias do monômero no segundo estágio da polimerização. Dessa forma, assegura-se a formação da casca polimérica ao redor do núcleo e não apenas a produção de uma mistura de partículas isoladas, sintetizadas a partir do primeiro e segundo estágios de polimerização (STUTMAN *et al.*, 1985).

## II) Polimerização em emulsão na presença de emulsificantes reativos

Um segundo processo que visa à síntese de partículas casca-núcleo envolve a polimerização em emulsão com o emprego de emulsificantes reativos. Esses compostos são capazes de copolimerizar com os monômeros empregados na reação, resultando na formação de uma fina casca de copolímero na superfície das partículas (LI e STÖVER, 2000). É importante destacar que tais surfactantes também podem ser empregados em processos de polimerização em emulsão com o uso de sementes, conferindo maior estabilidade ao látex formado ao final do processo. O emprego de surfactantes polimerizáveis evita a dessorção desses componentes da superfície das partículas

poliméricas ao final da polimerização e também dificulta a migração desses surfactantes durante a produção de filmes poliméricos, evitando alterações no brilho e na adesão de tais filmes (ROY *et al.*, 1999).

SOULA *et al.* (1999) pesquisaram a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, empregando surfactantes reativos (contendo unidades de estireno como grupo reativo) no processo de polimerização em emulsão com uso de sementes. As sementes foram inicialmente produzidas a partir de processo de polimerização em emulsão do metacrilato de metila. Após o tratamento, tais partículas foram empregadas em um processo de polimerização em emulsão subsequente, fazendo-se uso do surfactante reativo e da alimentação de uma mistura de comonômeros (metacrilato de metila e acrilato de butila) ao longo da reação. Foram obtidas ao final do processo partículas com núcleo de poli(metacrilato de metila) e casca formada por um filme polimérico de um copolímero (poli(acrilato de butila-co-metacrilato de metila)), que resultaram em um látex polimérico estável. O diâmetro médio das partículas produzidas variou na faixa entre 210 e 290 nm, a depender da condição operacional do experimento.

ROY *et al.* (1999) estudaram o desempenho de surfactantes contendo grupamentos reativos do tipo isobutileno em reações de copolimerização em emulsão alimentada do metacrilato de metila, ácido acrílico e acrilato de butila, empregando sementes de poli(estireno-co-metacrilato de metila). A estabilização das partículas poliméricas foi mais efetiva quanto tal surfactante foi empregado, quando comparada com os resultados obtidos quando o surfactante lauril sulfato de sódio foi utilizado.

### *III) Processo de Polimerização envolvendo Heterocoagulação*

Um terceiro processo empregado envolve a etapa de heterocoagulação de pequenas partículas poliméricas catiônicas a partículas poliméricas aniônicas, seguidas ou não de um tratamento térmico acima do valor da temperatura de transição vítrea (T<sub>g</sub>) dos polímeros da casca (LI e STÖVER, 2000).

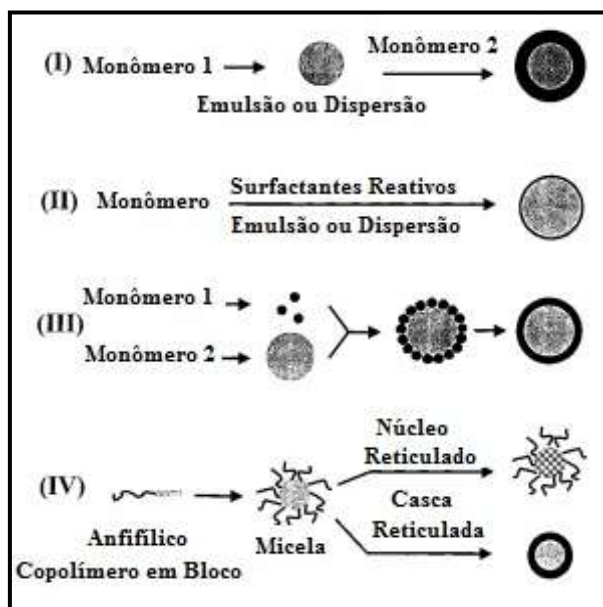
OTTEWILL *et al.* (1997) estudaram o processo de síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, a partir do recobrimento do núcleo, formado por partículas aniônicas de poliestireno, por pequenas partículas catiônicas de poli(metacrilato de butila). Após a realização de um processo térmico, houve a formação de um filme polimérico ao redor dos núcleos, gerando-se, ao final da reação, partículas poliméricas com estrutura casca-núcleo

IV) Copolimerização em Blocos

Esse processo engloba a síntese de nanopartículas casca-núcleo a partir da copolimerização em blocos. Inicialmente, sintetizam-se copolímeros em blocos (LI e STÖVER, 2000). Em seguida, realiza-se uma etapa adicional de reação ou de reticulação das cadeias poliméricas, ocorrendo então a formação do núcleo ou da casca (THURMOND *et al.*, 1997).

IJIMA *et al.* (1999) sintetizaram copolímeros anfífilicos de poli(ácido láctico)-b-poli(etilenoglicol), contendo grupamentos aldeído em uma extremidade e grupamentos metacrilato na outra. Os copolímeros anfífilicos se arranjaram, então, na forma de micelas no meio aquoso. Dessa forma, seguiu-se com a polimerização das extremidades metacrilato concentradas no interior das micelas, ocorrendo a formação de nanopartículas com morfologia casca-núcleo, com diâmetro entre 20 e 30 nm, que exibiam grupamentos aldeído na superfície.

Com o objetivo de facilitar a compreensão dos diferentes processos anteriormente descritos, é apresentada a Figura 2.



**Figura 2.** Processos que envolvem a síntese de nanopartículas com morfologia casca-núcleo (Adaptado de LI e STÖVER, 2000).

É importante ressaltar que todos os métodos descritos anteriormente envolvem a síntese de partículas casca-núcleo em escala nanométrica. No entanto, partículas em escala micrométricas são interessantes e igualmente importantes para aplicações nas áreas biomédica, analítica e ambiental. Poucos trabalhos na literatura descrevem a síntese de partículas casca-núcleo em escala micrométrica (LI e STÖVER, 2000). Alguns dos trabalhos encontrados serão descritos a seguir.

V) Polimerização em suspensão com o emprego de sementes

Uma técnica que pode ser empregada para a obtenção de partículas com diâmetros médios acima de 1000  $\mu\text{m}$  é a polimerização em suspensão com o uso de sementes. Essa metodologia envolve novamente duas etapas. Inicialmente, as sementes são produzidas por meio da polimerização em suspensão. Ao final da reação, as partículas são lavadas e secas. Em seguida, tais sementes são adicionadas a um meio monomérico que contém um iniciador dissolvido, tornando-se inchadas pela fase monomérica. Em decorrência da presença do iniciador, a segunda etapa da polimerização em suspensão é conduzida, havendo a formação de partículas com morfologia casca-núcleo (GONÇALVES *et al.*, 2008; GONÇALVES *et al.*, 2009).

GONÇALVES *et al.* (2008) estudaram a influência do tempo de difusão do monômero (no caso, metacrilato de metila) para o interior das sementes (poliestireno) sobre a morfologia final das partículas. Percebeu-se que o maior tempo de inchamento das partículas provocava um aumento na espessura da casca polimérica das partículas. Em um segundo estudo, GONÇALVES *et al.* (2009) analisaram a formação de partículas secundárias (que, na maioria das vezes, se deseja minimizar) em diferentes reações, empregando diferentes monômeros (estireno, metacrilato de metila e acrilato de metila) e iniciadores com solubilidades distintas. Foi possível notar que, quanto maior era a solubilidade do monômero na fase aquosa e mais hidrofóbico era o iniciador, maior era o favorecimento aos mecanismos de nucleação homogênea e de nucleação das gotas de monômero, ocorrendo maior formação de partículas secundárias.

HEYDARPOOR *et al.* (2015) estudaram a síntese de partículas poliméricas em suspensão na presença de sementes de poliestireno. A casca polimérica foi formada por um homopolímero (poli(metacrilato de metila)) ou um copolímero de poli(estireno-co-metacrilato de metila), empregando-se pentano como agente porogênico. Notou-se que,

além da morfologia final das partículas, a composição da casca alterava a difusão do composto porogênico para o interior das sementes.

Outra técnica que envolve a polimerização em suspensão foi desenvolvida por GU *et al.* (2005). Inicialmente, foi realizado um processo de polimerização em emulsão, ocorrendo a síntese do látex. Em seguida, a este látex foram adicionados monômero e iniciador, sendo conduzida outra reação de polimerização, havendo o recobrimento das sementes e a geração de nanopartículas com morfologia casca-núcleo. O processo em emulsão foi, então, transformado em suspensão, por meio da quebra da estabilidade do látex (com a adição de eletrólitos) e da adição dos componentes clássicos da polimerização em suspensão. Assim, ocorreu a produção de micropartículas poliméricas, com diâmetro médio em torno de 1 a 2  $\mu\text{m}$ , contendo em seu interior nanopartículas do tipo casca-núcleo.

#### VI) Polimerização por Dispersão

Na maioria das vezes, a síntese de partículas casca-núcleo a partir do processo de polimerização por dispersão segue dois mecanismos distintos: a polimerização por dispersão com emprego de sementes; ou com uso de estabilizante com características reacionais particulares, em função de grupamentos funcionais (conferindo funcionalidade específica às partículas produzidas). Esses processos, em geral, resultam em partículas com diâmetros médios na faixa de 2 a 10  $\mu\text{m}$  (LI e STÖVER, 2000). Trabalhos envolvendo as técnicas mencionadas serão apresentados seguir.

LAUS *et al.* (1996) estudaram a síntese de micropartículas poliméricas de poliestireno com diâmetros de 3 a 10  $\mu\text{m}$  por meio do processo de polimerização em dispersão na presença de um copolímero de ácido metacrílico e acrilato de etila, usado como estabilizante, e empregando etanol como solvente. Tais partículas apresentaram núcleos rígidos de poliestireno, resultado da polimerização em dispersão, e uma superfície hidrofílica, em função das cadeias poliméricas do copolímero. Esse é um dos poucos trabalhos encontrados que envolvem a síntese de partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo com o objetivo de empregá-las na área da biocatálise como suporte para imobilização de enzima, apesar de nenhum resultado concreto envolvendo a etapa da imobilização ter sido apresentado.

Como mencionado, outra técnica muito utilizada para a obtenção de partículas do tipo casca-núcleo é a polimerização por dispersão empregando sementes. Nesses

processos, em geral a viscosidade das sementes é tão elevada que as cadeias poliméricas presentes no meio, formadas a partir da polimerização por dispersão, não conseguem difundir para o interior da partícula. Dessa forma, os polímeros formados passam a se acumular sobre a superfície das sementes (OKUBO *et al.*, 1997). OKUBO *et al.* (1997; 1999) sintetizaram partículas casca-núcleo a partir de reações de polimerização por dispersão com o uso de sementes. Inicialmente, partículas de poli(metacrilato de metila) foram produzidas por meio da polimerização por dispersão. Em seguida, tais partículas foram utilizadas como sementes em outra reação de polimerização por dispersão, empregando estireno como monômero nesta segunda etapa. Ao final do processo foram obtidas partículas casca-núcleo com diâmetro médio em torno de 2  $\mu\text{m}$ .

#### VII) Reação de Saponificação para formação da Casca

A formação da casca também pode ser resultado de reações de saponificação parcial da superfície de um núcleo polimérico, ocorrendo a formação de partículas com morfologia casca-núcleo na faixa de 100 a 200  $\mu\text{m}$  (PEIXOTO *et al.* 2006, 2009, 2011). É importante destacar que este é um tipo de polimerização que envolve uma reação química de componentes do núcleo e não o depósito de outro tipo de partícula sobre a superfície. PINTO *et al.* (2004b, 2006) depositaram patentes referentes ao processo de síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, formadas por núcleo de poli(acetato de vinila) e casca de poli(álcool vinílico), e também à aplicação de tais partículas em procedimentos de embolização vascular. Vale observar que PEIXOTO *et al.* (2011) empregaram heptano durante a reação de polimerização com o objetivo de tornar as partículas porosas e reduzir a densidade final das partículas.

OLIVEIRA *et al.* (2015) empregaram a mesma metodologia descrita acima para a síntese de partículas casca-núcleo. No entanto, focaram o estudo na avaliação da influência da etapa da reação de hidrólise sobre a morfologia final das partículas produzidas. Dessa forma, foi possível notar que condições operacionais brandas não provocavam mudanças significativas na morfologia de tais partículas. Contudo, as reações de hidrólise poderiam provocar alterações na distribuição de tamanho de partícula e na massa molar dos copolímeros.

*VIII) Polimerização por Precipitação*

A produção de partículas com morfologia casca-núcleo por meio da polimerização por precipitação pode ser conduzida tanto em processos em semibatelada quanto em batelada em dois estágios, com o emprego de sementes. As partículas produzidas, em geral, apresentaram diâmetro médio na faixa de 2 a 8  $\mu\text{m}$  (LI e STÖVER, 2000).

LI e STÖVER (2000) sintetizaram partículas poliméricas reticuladas de polidivinilbenzeno com morfologia casca-núcleo. Para formação da casca foram empregados comonômeros funcionais, como anidrido maleico, metacrilato de glicidila e cloro-metil-estireno. O emprego de um co-solvente (no caso, tolueno) na etapa de formação da casca possibilitou a geração de partículas micrométricas que continham poros na casca. Neste trabalho foram estudados dois processos: um processo no qual as partículas densas do núcleo eram separadas e alimentadas como semente em outro processo de polimerização por precipitação; e um processo em que, a partir de um determinado tempo de reação, os novos componentes eram alimentados ao reator e os oligômeros formados passavam a recobrir o núcleo denso por precipitação. Assim, a depender das condições operacionais adotadas, ambos os processos resultavam em partículas esféricas, contendo ou não grupamentos funcionais na casca, com diâmetro médio em torno de 2 a 8  $\mu\text{m}$  e com diâmetro médio de poro entre 30 e 40 Å.

BAI *et al.* (2005) também estudaram a síntese de micropartículas a partir da técnica de polimerização por precipitação. Nesse estudo, foi realizada apenas a metodologia que envolvia a adição de componentes funcionais durante uma já iniciada reação de polimerização. Dessa forma, foram estudadas copolimerizações de metacrilato de hidroxietila com divinilbenzeno não reagido (presente na superfície da partícula), ocorrendo a formação de partículas com morfologia casca-núcleo que apresentavam grupamentos hidroxila na superfície. As partículas produzidas apresentaram diâmetros que variaram de 2,8 a 3,4  $\mu\text{m}$ .

É importante mencionar ainda que há diversos processos de polimerização que empregam partículas inorgânicas na composição do núcleo ou da casca das partículas casca-núcleo, com o objetivo de alterar as propriedades finais dos materiais particulados. São inúmeros os processos estudados: polimerização em emulsão, dispersão, miniemulsão e suspensão. Alguns dos trabalhos encontrados na literatura são apresentados a seguir.



*IX) Polimerização com o emprego de componentes inorgânicos*

Em muitos estudos são realizadas funcionalizações da casca ou da casca e do núcleo com componentes inorgânicos, alterando ainda mais as propriedades dos materiais produzidos. WU *et al.* (2008) apresentaram uma série de estudos envolvendo a síntese e a aplicação de nanopartículas magnéticas à base de óxido de ferro. Tais partículas também vêm sendo utilizadas com outros materiais poliméricos (gelatina, quitosana, polietilenoglicol, poli(ácido acrílico), dentre outros), de forma a apresentar não apenas propriedades magnéticas, mas também características como biocompatibilidade, a depender dos polímeros empregados. ZHANG *et al.* (2003) estudaram a síntese de partículas de poliestireno a partir do processo de polimerização em emulsão com o emprego de sementes de sílica. Tais materiais têm apresentado grande potencial para a síntese de dispositivos fotônicos. KURZHALS *et al.* (2017) sintetizaram nanopartículas casca-núcleo contendo núcleo de óxido de ferro e casca de poli(N-isopropilacrilamida), buscando produzir materiais que respondessem a estímulos térmicos. Estudos como este, que focam no desenvolvimento de materiais que combinam propriedades distintas, mas que respondem a estímulos específicos, também têm estimulado a síntese de novas partículas casca-núcleo.

Diante de tudo que foi apresentado, é possível observar que são inúmeros os processos empregados para a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, podendo ser conduzidos em batelada ou em semi-batelada. Além disso, a geração da casca pode ser decorrente de outro processo de polimerização, havendo deposição de material sobre o núcleo; ou reações químicas envolvendo os componentes do núcleo. As partículas produzidas podem apresentar escala nanométrica, mais largamente estudada, ou micrométrica. Além disso, as partículas podem ser maciças ou porosas. Vale ressaltar que muitos trabalhos da literatura adicionam outros compostos às reações, chamados de compostos porogênicos, para a geração de poros nas partículas poliméricas em uma segunda etapa reacional (GOKMEN e DU PREZ, 2012). Assim, pôde-se perceber que poucos estudos têm sido realizados com o objetivo de sintetizar partículas micrométricas porosas com morfologia casca-núcleo, materiais de grande interesse para a área da biocatálise.

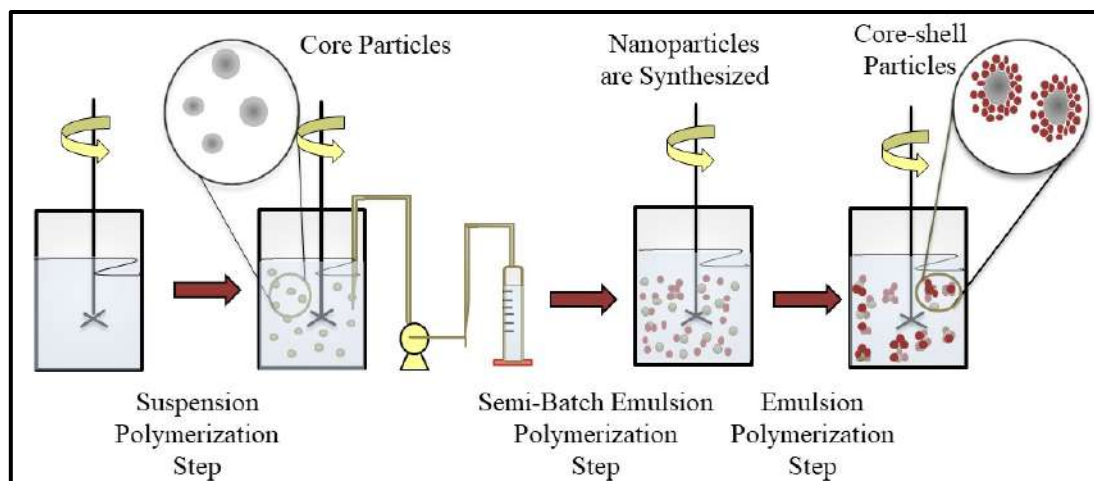
### ***2.1.6. Partículas Casca-Núcleo Sintetizadas a partir da Polimerização em Suspensão e Emulsão Simultâneas***

Uma técnica que resulta na síntese de partículas micrométricas porosas foi desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003). O processo, também conhecido por polimerização simultânea em suspensão e emulsão, envolve duas etapas. Inicialmente uma polimerização em suspensão clássica, do tipo pérola, é conduzida, ocorrendo a formação de núcleos poliméricos. Quando a polimerização em suspensão atinge uma determinada conversão, os componentes de uma polimerização em emulsão são adicionados ao reator e inicia-se a alimentação da fase monomérica. Dessa forma, as duas reações passam a ser conduzidas simultaneamente no mesmo reator. O núcleo, em função do seu caráter adesivo, passa a capturar as partículas geradas pela polimerização em emulsão, resultando no recobrimento e na geração de partículas porosas com morfologia casca-núcleo. Vale notar que o objetivo desta técnica é favorecer a formação de partículas secundárias (geradas predominantemente a partir da nucleação micelar), pois estas partículas são capturadas e recobrem o núcleo polimérico.

Este trabalho resultou no depósito de uma patente referente tanto à nova técnica desenvolvida quanto ao emprego de tais partículas como suporte para a imobilização de células e enzimas (PINTO *et al.*, 2004a). A Figura 3 ilustra a morfologia das partículas produzidas por meio do processo de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Na Figura 4 é possível observar de forma simplificada esse processo de polimerização.



**Figura 3.** Partícula sintetizada a partir da técnica de polimerização simultânea em suspensão e emulsão (*Fonte LENZI et al., 2003*).



**Figura 4.** Processo de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas (*Fonte PINTO et al., 2014*).

É importante ressaltar que esse processo apresenta inúmeras vantagens, principalmente quando se vislumbra a aplicação de tais partículas como suporte para a síntese de biocatalisadores. Primeiramente, a técnica permite a obtenção de partículas micrométricas, facilitando os processos de separação do biocatalisador do meio reacional em que devem ser empregados. Além disso, a técnica possibilita a geração de partículas porosas, com diâmetros de poro largos o suficiente (acima de 150 Å) para permitir a entrada da enzima para regiões mais internas da casca (BESTETI, 2011; CUNHA *et al.*, 2014; PINTO *et al.*, 2014). A geração de poros alcançada por meio desta técnica de polimerização a diferencia dos demais processos até então apresentados, uma vez que tais processos resultam em partículas rígidas ou requerem a adição de compostos porogênicos ao meio reacional. O único trabalho encontrado que utilizou compostos porogênicos na composição da casca das micropartículas casca-núcleo resultou em poros cujos diâmetros variaram de 30 a 40 Å, poros estes que só permitem a interação da enzima CAL-B (utilizada neste trabalho) com a região externa da casca. Ademais, essa técnica possibilita a funcionalização de partículas, por meio da alteração da composição da casca polimérica. Outra vantagem é a condução simultânea dos dois processos no mesmo reator, sem haver a necessidade de etapas adicionais de separação, purificação e funcionalização.

LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) notaram que a formação da casca polimérica dependia da conversão apresentada pelo núcleo. Dessa forma, quando o núcleo atingia uma conversão muito alta, tornava-se tão rígido que não era capaz de capturar as partículas emulsificadas com eficiência, havendo uma queda pronunciada da área

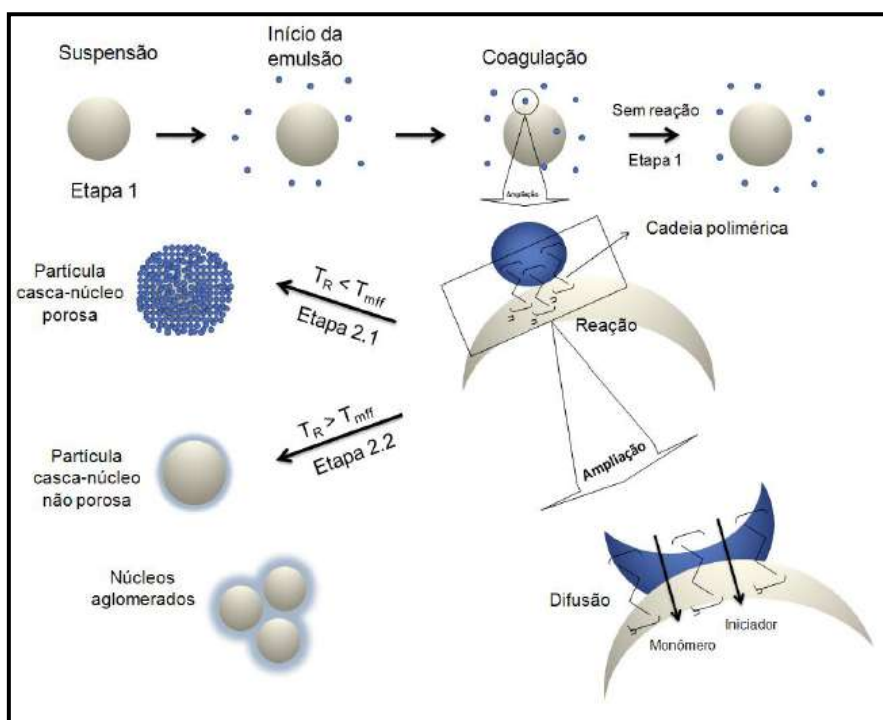
específica das partículas casca-núcleo. Além disso, percebeu-se também que o maior tamanho das partículas do núcleo resultava em uma menor área de contato com as partículas emulsificadas, provocando novamente uma diminuição da eficiência de recobrimento. LENZI *et al.* (2006) estudaram o emprego da técnica de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) para controlar e monitorar esse tipo de reação de polimerização, acompanhando com êxito a formação da casca polimérica.

Uma técnica semelhante à desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) foi realizada por ZHENQIAN *et al.* (2008). No entanto, vale salientar que neste estudo uma emulsão (composta por todos os reagentes típicos desses sistemas) foi alimentada, e não apenas o monômero, como foi realizado por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003), o que aumenta as chances de incrustação na bomba de alimentação. ZHENQIAN *et al.* (2008) estudaram a síntese de partículas com núcleo de poliestireno e casca de poli(metacrilato de metila). Inicialmente foi realizado um processo de polimerização em suspensão do estireno, seguido de uma polimerização em emulsão do metacrilato de metila, ambos no mesmo reator. Observou-se, então, que os componentes da emulsão afetavam tanto a distribuição de tamanhos das partículas formadas como a eficiência na formação da casca, como pôde ser observado mais tarde por PINTO (2013). Além disso, como já tinha sido notado por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003), percebeu-se que o instante a partir do qual os componentes da emulsão eram adicionados afetava de maneira significativa a morfologia das partículas produzidas. É importante observar que a porosidade e a área específica das partículas sintetizadas neste estudo não foram apresentadas.

PENG *et al.* (2011) estudaram a síntese de partículas casca-núcleo empregando uma técnica similar à desenvolvida por ZHENQIAN *et al.* (2008). Primeiramente foi realizado um processo de copolimerização em suspensão, gerando núcleos poliméricos que continham flúor em sua estrutura. Quando o núcleo atingiu determinada conversão, uma emulsão previamente preparada foi alimentada ao sistema; ambos os processos passaram a ser conduzidos simultaneamente. Pôde-se perceber, assim como foi notado nos estudos anteriormente mencionados, que o grau de conversão do núcleo afetava a formação das partículas casca-núcleo. Vale destacar que novamente não foram analisadas as áreas específicas nem as porosidades das partículas produzidas.

A técnica desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) também foi empregada por BESTETI (2009), BESTETI (2011), BESTETI *et al.* (2011) para a síntese

de partículas com morfologia casca-núcleo. Ambos os estudos buscaram avaliar a influência das composições da casca e do núcleo sobre a porosidade e a área específica dos suportes produzidos. Percebeu-se inicialmente que, para ocorrer uma formação eficaz da casca, o monômero constituinte dessa estrutura precisava ser compatível quimicamente com o monômero que compunha o núcleo polimérico, havendo a formação de copolímeros na interface entre o núcleo e a casca quando monômeros distintos eram empregados. Notou-se também que a composição química da casca afetava profundamente a morfologia final da mesma. Quando a casca polimérica era formada por polímeros cuja temperatura de transição vítrea era inferior à temperatura do meio reacional, havia a formação de um filme ao redor do núcleo, sem haver a formação de poros. Contudo, quando a temperatura de transição vítrea do polímero da casca era maior que a temperatura do meio reacional, ocorria a formação de uma casca porosa. Na Figura 5 é possível observar a influência da temperatura de transição vítrea dos polímeros da casca na morfologia final das partículas casca-núcleo.



**Figura 5.** Mecanismo de formação das partículas com morfologia casca-núcleo (Fonte BESTETI, 2009).

BESTETI (2011) e CUNHA *et al.* (2014) também empregaram o processo apresentado por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) para a síntese de partículas com

estrutura casca-núcleo, utilizando como comonômero o divinilbenzeno. Assim, pôde-se notar que a adição de divinilbenzeno como comonômero na síntese da casca e do núcleo das partículas poliméricas provocava um aumento na porosidade e na área específica dos materiais produzidos, sendo obtidas partículas com área específica de até 28,9 m<sup>2</sup>/g (partículas com casca e núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno)). Tais partículas foram empregadas com êxito como suporte para imobilização da lipase B de *Candida antarctica*, apresentando resultados próximos aos observados para o biocatalisador comercial *Novozym 435*.

PINTO (2013) e PINTO *et al.* (2014) utilizaram a mesma técnica apresentada para avaliar a influência das variáveis operacionais sobre a morfologia das partículas casca-núcleo de poliestireno. Foi possível observar que todas as variáveis operacionais investigadas (concentrações na etapa de emulsão de iniciador, emulsificante e monômero, além da vazão de alimentação de monômero) alteravam a morfologia final das partículas produzidas, resultando em suportes com áreas específicas próximas inclusive das áreas específicas de suportes comerciais (uma das condições selecionadas resultou em suporte com 35 m<sup>2</sup>/g). Percebeu-se também a existência de um limite operacional máximo de vazão de alimentação de monômero na faixa de 0,082 a 0,12 L/h, acima do qual o controle do sistema era perdido, resultando na formação de grandes aglomerados poliméricos. Observou-se também que concentrações intermediárias de iniciador e de emulsificante geravam suportes com valores pronunciados de área específica. Notou-se ainda que o aumento da área específica dos suportes estava relacionado principalmente à quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo polimérico e não à morfologia de tais partículas. As partículas produzidas também foram empregadas com eficiência na imobilização da lipase B de *Candida antarctica* e os parâmetros de imobilização também foram avaliados.

BESTETI (2011) e BESTETI *et al.* (2014b) avaliaram o efeito da incorporação do cardanol (0 a 20 % da massa total de monômero empregada na reação) na composição da casca polimérica das partículas com morfologia casca-núcleo sintetizadas por meio da polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. O cardanol, por ser um reagente que apresenta extensa cadeia carbônica, despertou a atenção de especialistas na síntese de suportes para imobilização de enzimas. Percebeu-se por meio do estudo realizado que, quando o sistema era operado em batelada, não ocorria a formação das partículas esféricas sólidas, características dos processos em suspensão, mas de uma espécie de látex. No entanto, a adição de cardanol apenas na composição da casca resultou na formação de

partículas com morfologia casca-núcleo com diâmetro em torno de 100 a 500  $\mu\text{m}$ , área específica de 6,2  $\text{m}^2/\text{g}$  e diâmetro de poro de 251  $\text{Å}$ . Dessa forma, foi possível notar que a adição de tal componente provocava alterações pronunciadas na morfologia das partículas produzidas e resultava em biocatalisadores com bom desempenho.

As condições definidas como ótimas a partir do trabalho de PINTO (2013) e PINTO *et al.* (2014) foram utilizadas no estudo realizado por CIRILO *et al.* (2014). O trabalho teve o objetivo de copolimerizar diferentes comonômeros de cadeia longa (1-octeno, divinilbenzeno, cardanol, benzoato de vinila e estireno) na composição da casca polimérica e avaliar a influência desses componentes na morfologia final das partículas e no desempenho como suporte para a síntese de biocatalisadores. O teor de comonômero empregado em cada uma das reações correspondeu a 5% em massa do valor total de monômero empregado na formação da casca. Assim, foi possível observar que pequenas modificações na composição da casca polimérica provocavam modificações expressivas na morfologia (área específica e diâmetro médio de poro) final das partículas e grau de hidrofobicidade dos materiais, que, por sua vez, também afetavam a cinética de imobilização e o desempenho final dos biocatalisadores produzidos. Novamente, os suportes em que divinilbenzeno foi empregado apresentaram as maiores áreas específicas.

Com base nos estudos apresentados, é possível perceber que inúmeros avanços ocorreram nos últimos anos envolvendo tanto os processos relacionados à síntese de partículas casca-núcleo por meio da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, quanto aos procedimentos de funcionalização de tais partículas. Contudo, nota-se que apenas quatorze trabalhos foram realizados nessa área, sendo que parte deles engloba patente e artigos derivados de teses e dissertações. Dessa forma, nota-se que apenas oito trabalhos foram realizados envolvendo estudos distintos; resultado ínfimo quando comparado aos demais processos usados para a síntese de partículas casca-núcleo.

### ***2.1.7. Comentários Finais***

Por tudo o que foi apresentado, percebe-se que poucos trabalhos envolvem a síntese de partículas com morfologia casca-núcleo a partir do processo em suspensão e emulsão simultâneas. Foi possível notar que um número ainda mais reduzido visou à funcionalização da casca polimérica, vislumbrando obter um melhor desempenho dos biocatalisadores produzidos.

É importante observar também que os trabalhos que resultaram em suportes com áreas específicas pronunciadas envolveram a adição de divinilbenzeno como comonômero, conferindo maior porosidade às partículas produzidas. Assim, o emprego desse componente em estudos voltados à síntese de novos suportes enzimáticos foi estimulado.

Nenhum estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a resistência mecânica das partículas casca-núcleo, sintetizadas a partir do processo de interesse. Esta propriedade é importantíssima quando se considera a síntese de biocatalisadores e a necessidade de reutilizar os mesmos em diferentes ciclos. Ademais, nenhum trabalho foi realizado almejando escalonar o processo de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, etapa fundamental quando se vislumbra uma aplicação comercial real das partículas casca-núcleo.

Dessa forma, o presente trabalho visou, inicialmente, a produzir novas partículas com morfologia casca-núcleo por meio da técnica de polimerização em suspensão-emulsão simultâneas. A estabilidade mecânica de tais partículas casca-núcleo também foi avaliada. Diferentes estratégias foram adotadas, alterando-se as condições operacionais da reação, de forma a aumentar a área específica e a porosidade dos suportes produzidos. A partir de então, foi iniciado um estudo de escalonamento do processo de polimerização (nunca estudado em larga escala). As etapas subsequentes, referentes à síntese dos biocatalisadores e à avaliação de seus desempenhos e à funcionalização das partículas poliméricas, serão apresentadas com mais detalhe nos próximos capítulos.

Nota-se, então, que o presente estudo pode permitir o desenvolvimento de suportes mais eficientes para a imobilização de diversas enzimas, apresentando caráter bastante inovador.

## ***2.2. Materiais e Metodologias em Escala Bancada***

Esta seção visa a descrever tanto os materiais empregados nas reações de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas em escala de bancada quanto os métodos de produção das partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo. As técnicas utilizadas para a caracterização de tais partículas também são apresentadas.



### 2.2.1. *Materiais em Escala Bancada*

Cada um dos reagentes empregados diretamente na reação de polimerização será descrito a seguir. Vale salientar que todos os reagentes foram utilizados como recebido, sem haver qualquer etapa intermediária de purificação. Apenas o comonômero estireno (S) (utilizado nas primeiras onze reações de polimerização), fornecido pela Innova S/A, passou por um processo prévio de destilação. Nas demais reações, foi utilizado como comonômero o estireno fornecido pela Sigma Aldrich Ltda. com pureza mínima de 99%. Divinilbenzeno (DVB) também foi empregado como comonômero nas reações de polimerização, sendo fornecido por duas empresas distintas: divinilbenzeno fornecido pela Merck ES (contando 25 - 50 % em massa de etilestireno), usado nas onze reações iniciais; divinilbenzeno com grau técnico de 80% (contando 20% em massa de etilestireno), fornecido pela Sigma Aldrich Ltda., utilizado nas demais reações de polimerização. Na etapa de polimerização em suspensão, foi empregado como agente de suspensão o poli(álcool vinílico) P.S. (PVA), fornecido pela Vetec Química Fina Ltda., com grau de hidrólise na faixa de 86,5 a 89,5% e Mw de 78.000 g/mol. O iniciador empregado também nesta etapa foi peróxido de benzoíla P.S. (BPO), fornecido pela Vetec Química Fina Ltda., com teor máximo de umidade de 25%.

Na etapa em emulsão, o iniciador utilizado foi o persulfato de potássio P.A. ( $K_2S_2O_8$ ) com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. O emulsificante empregado foi o lauril sulfato de sódio (SLS), fornecido pela Vetec Química Fina, com pureza mínima de 90% (contendo 10% de umidade). O bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ ) foi fornecido pela Proquimios Ltda. com pureza mínima de 99,7%, sendo usado no preparo da solução tampão, também adicionada na etapa da polimerização em emulsão. Água destilada foi utilizada para preparar as soluções aquosas de PVA,  $K_2S_2O_8$ , SLS e  $NaHCO_3$  e para lavar as partículas na etapa da lavagem e filtração.

É importante destacar também alguns reagentes que foram empregados na etapa de caracterização das partículas produzidas ao final das reações de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. A hidroquinona, por exemplo, fornecida pela Vetec Química Fina Ltda. com pureza mínima de 99%, foi utilizada como inibidor para garantir o término da reação de polimerização, possibilitando a análise da cinética de cada reação. O gás nitrogênio, fornecido pela Air Products com pureza mínima de 99%, foi empregado nas análises de caracterização de DSC e de área específica, volume específico de poros e

diâmetro médio de poros. Etanol P.A., fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. com pureza mínima de 99,8%, foi usado na análise de determinação de tamanhos das partículas com morfologia casca-núcleo. O tetrahidrofurano (THF) grau HPLC/Spectro com pureza mínima de 99,8%, fornecido pela Tedia Company Inc., foi empregado na análise de GPC como fase móvel e para solubilizar as amostras poliméricas.

### **2.2.2. Metodologia em Escala Bancada**

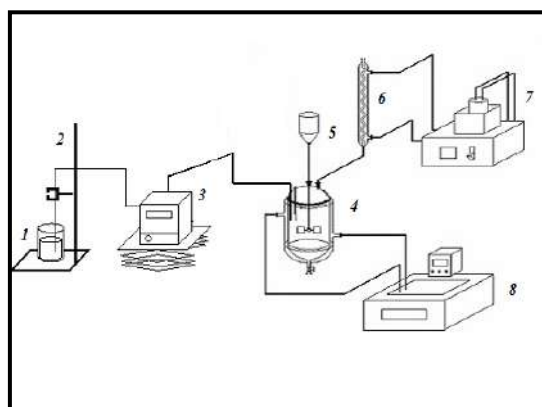
As partículas porosas poliméricas com morfologia casca-núcleo foram sintetizadas por meio da técnica de polimerização em suspensão-emulsão simultâneas (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003). Como mencionado anteriormente, esta técnica de polimerização compreende duas etapas fundamentais: inicialmente, uma reação de polimerização em suspensão é conduzida, ocorrendo a formação dos núcleos; em seguida, os componentes da emulsão são alimentados, gerando pequenas partículas no meio reacional, que recobrem os núcleos poliméricos, resultando nas partículas com morfologia casca-núcleo. É possível perceber que diferentes comonômeros podem ser empregados nas reações de polimerização, possibilitando a produção de partículas poliméricas com propriedades químicas e morfológicas distintas. As diversas reações realizadas seguiram a metodologia descrita em inúmeros trabalhos já apresentados na seção anterior (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003; BESTETI, 2009; BESTETI, 2011; PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2014; CIRILO *et al.*, 2014; MANOEL *et al.*, 2016a; MANOEL *et al.*, 2016b).

Nas reações realizadas no presente capítulo foram empregados como comonômeros apenas estireno, divinilbenzeno e metacrilato de metila (utilizado nas reações em escala piloto). Contudo, como mencionado anteriormente, outros monômeros foram empregados na etapa seguinte deste trabalho, como metacrilato de glicidila e pentafluoroestireno (as especificações de cada um serão detalhadas no **Capítulo IV**).

Todas as reações conduzidas em escala de bancada foram realizadas de forma aberta em um reator de vidro borossilicato encamisado com capacidade de 1 L (FGG Equipamentos Científicos, São Paulo, Brasil). A temperatura do meio reacional em todos os experimentos foi mantida em 85 °C, com auxílio de um banho térmico modelo Haake Phoenix II, da empresa Thermo Scientific. Com o objetivo de manter a temperatura do condensador em 10 °C em todos os experimentos e evitar a perda de reagentes ao longo

da reação, foi empregado um banho termostático, modelo 521-2D (Nova Ética). Para garantir a agitação e a homogeneidade do meio ao longo de cada reação foi utilizado um agitador mecânico de aço inox (IKA RW20 digital) com haste reta e impelidor com seis pás dispostas verticalmente. Na Figura 6 é possível observar a unidade experimental utilizada para a produção das partículas com morfologia casca-núcleo.

Uma etapa que antecedeu o início da reação envolveu o preparo da fase orgânica (formada por estireno, divinilbenzeno e peróxido de benzoíla), realizado na temperatura ambiente, de forma a evitar um possível início da polimerização. O início exato da reação em suspensão era considerado após a dispersão da fase monomérica na solução aquosa de agente de suspensão, previamente aquecida a 85 °C, e o subsequente ajuste da velocidade de agitação para o valor desejado, mantido em (800±50) rpm em todos os experimentos. É importante mencionar que as soluções de PVA e de hidroquinona, mantida na geladeira após o preparo, eram preparadas ao menos 12 horas antes do início da reação.



- 1 - Proveta para alimentação de monômero;
- 2 - Suporte;
- 3 - Bomba Dosadora;
- 4 - Reator;
- 5 - Impelidor;
- 6 - Condensador;
- 7 e 8 - Banho termostático;

(A)



(B)

**Figura 6.** Unidade Experimental em escala de bancada: **(A)** Esquema ilustrativo; **(B)** Unidade empregada para produção das partículas casca-núcleo.

Sabe-se que o grau de recobrimento das partículas poliméricas está associado à conversão atingida pelo núcleo durante a etapa de suspensão (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003). BESTETI (2009) observou que a alteração da duração da etapa da suspensão resultou em partículas com áreas específicas distintas: partículas com núcleo de poliestireno (2h de suspensão) e casca de poli(metacrilato de metia) apresentaram área específica de 36,7 m<sup>2</sup>/g (maior área obtida em tal estudo); quando a etapa da suspensão foi alterada para 4h, houve uma queda da área específica para 0,9 m<sup>2</sup>/g. Dessa forma, para a maior parte das reações, a etapa em suspensão teve duração de 2h. Contudo, como no presente trabalho a composição química do sistema foi alterada, reações em suspensão com grau de conversão ainda menores foram realizadas, com o objetivo de avaliar a influência desse parâmetro sobre o grau de recobrimento das partículas preparadas.

Após o término da reação em suspensão, os vários componentes da emulsão eram adicionados ao meio reacional (carga inicial de comonômeros, estireno e divinilbenzeno, água destilada e soluções aquosas de persulfato de potássio, bicarbonato de sódio e lauril sulfato de sódio). A solução tampão, como já mencionado, confere maior estabilidade à emulsão (LENZI, 2002). Já a água destilada tem por função completar o meio reacional, garantindo a melhor dispersão das partículas poliméricas. Para evitar uma queda pronunciada na temperatura do meio reacional, estabeleceu-se um intervalo de 2 min entre cada uma das adições. Apenas as adições da carga monomérica inicial e da solução de iniciador (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) ocorriam de forma subsequente. Vale salientar que a solução de emulsificante foi preparada ao menos 12 horas antes do início da reação, de maneira a garantir a solubilização completa do lauril sulfato de sódio. Já as soluções tampão e de iniciador, cuja solubilização não demora mais do que 30 min, foram preparadas no momento em que a polimerização em suspensão era realizada.

Findada a etapa de adição dos componentes da emulsão, iniciava-se a alimentação contínua de comonômeros ao meio reacional a uma vazão especificada. A adição gradual do restante do conteúdo monomérico tinha por objetivo evitar o descontrole térmico da reação e a aglomeração da massa polimérica. Para garantir um controle mais preciso da vazão, foi utilizada uma proveta de 100 mL e uma bomba dosadora (Prominent, modelo GALA1000SST000UA002100; com cabeça de bombeamento de aço inox). O instante em que a primeira gota da mistura de monômeros desprendia-se da mangueira de alimentação e atingia o meio reacional era considerado o início da etapa de emulsão alimentada. A partir desta etapa, então, ambas as reações (suspensão e emulsão) passavam

a ser conduzidas no mesmo reator simultaneamente. Todas as condições operacionais ajustadas para a reação em suspensão eram mantidas (temperatura de 85 °C e velocidade de agitação de (800±50) rpm). A duração desta etapa variava, a depender da vazão de alimentação de comonômeros e da quantidade de reagente alimentada. Ao longo de todas as reações, a vazão nominal da bomba era alterada, de forma a estar mais próxima do valor desejado. Ao terminar a alimentação da fase monomérica, prosseguia-se com mais duas horas de emulsão, para garantir o recobrimento dos núcleos poliméricos. Ao longo de cada reação eram coletadas alíquotas para posterior determinação do grau de conversão alcançado em cada instante de tempo (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003).

É importante salientar que em uma das reações de polimerização foi alimentada uma miniemulsão ao meio reacional e não apenas uma mistura de comonômeros. O preparo da miniemulsão envolveu todos os componentes da emulsão já descritos, alimentados a um homogeneizador de alta pressão (modelo APLAB-10 / 1.000 Bar, fornecido pela Artepeças) operando a 100 bar por 20 min. Nesse tipo de sistema, as gotículas da fase orgânica se chocam contra as paredes do equipamento, estando submetidas a elevadíssimas tensões de cisalhamento. Dessa forma, gotículas ainda menores são formadas. Com o objetivo de evitar a desestabilização da miniemulsão antes de ser alimentada ao meio reacional, após cada hora os componentes eram recirculados no interior do homogeneizador.

Após o término da reação, o sistema era então resfriado, garantindo a interrupção da reação. Ao final do processo, duas fases eram formadas: decantado, formado pelas partículas com morfologia casca-núcleo; e sobrenadante, constituído por partículas emulsificadas, não capturadas pelo núcleo adesivo, que permaneciam ainda dispersas no sobrenadante ao final da reação. Esse látex era recolhido no dia seguinte a cada reação, de maneira a garantir que os sobrenadantes de todas as reações fossem coletados sob as mesmas condições e de forma a dificultar que partículas menores ainda em suspensão fossem recolhidas. Seguia-se, então, com a filtração e lavagem das partículas casca-núcleo, eliminando possíveis componentes do meio reacional ainda presentes na superfície de tais suportes. O papel de filtro empregado nesta etapa apresentava poros com diâmetro de 14 µm (Qualy, gramatura 80). Por fim, as partículas casca-núcleo eram secas em estufa de recirculação a 40 °C, onde permaneciam até o valor da massa seca não variar de forma expressiva, sendo então caracterizadas e armazenadas.

Os diferentes suportes, com diferentes propriedades, foram sintetizados a partir da manipulação de algumas variáveis: razão mássica dos comonômeros adicionados ao meio reacional (estireno/divinilbenzeno); instante em que a reação em suspensão era interrompida e os componentes da emulsão passavam a ser alimentados à reação; forma de adição dos componentes da emulsão (apenas como uma mistura de comonômeros ou uma miniemulsão); vazão de alimentação de comonômeros (V). Vale destacar que CUNHA *et al.* (2014) realizaram experimentos em que uma quantidade expressiva do comonômero divinilbenzeno foi adicionada ao meio reacional (3:1, DVB:S), resultando em uma diminuição das áreas específicas das partículas produzidas. Dessa forma, uma razão mássica intermediária também foi avaliada em uma das reações (2:3, DVB:S). É importante mencionar novamente que, a partir da reação 12, monômeros oriundos de outros fornecedores foram empregados. Assim, duas reações foram realizadas de forma similar a outras duas previamente realizadas, com o objetivo de avaliar se a pureza dos reagentes poderia alterar de forma significativa as propriedades das partículas produzidas.

As composições das fases em cada um dos experimentos realizados são mostradas na Tabela 1 (etapa da polimerização em suspensão) e na Tabela 2 (etapa da polimerização em emulsão). Nas reações realizadas no presente trabalho, foram empregados na etapa de suspensão 100 g de mistura monomérica (mistura de estireno e divinilbenzeno) e na etapa em emulsão novamente 100 g de mistura monomérica, divididos em 30 g na carga inicial e 70 g na etapa de alimentação.

**Tabela 1.** Percentagem mássica de cada um dos componentes adicionados na etapa de polimerização em suspensão, utilizando como base 100 g de mistura monomérica.

<b>Etapa de Suspensão</b>			
Reação	Agente de Suspensão (PVA) (%)	Água Destilada (%)	Iniciador (BPO) (%)
1 – 16 (exceto 14)	3,0	370,0	4,0

**Tabela 2.** Percentagem mássica de cada um dos componentes adicionados na etapa de polimerização em emulsão, empregando como base 100 g de mistura monomérica.

<b>Etapa de Emulsão</b>				
Reação	Iniciador (K <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>8</sub> ) (%)	Emulsificante (SLS) (%)	Bicarbonato (NaHCO <sub>3</sub> ) (%)	Água Destilada (%)
1 / 12 <sup>1</sup>	0	0	0	0
14 <sup>2</sup>	0,3	2,5	0,3	227,0
2 – 11 / 13 – 16	0,3	2,5	0,3	227,0

<sup>1</sup> Em ambas as reações foram sintetizadas apenas as partículas formadoras do núcleo polimérico, por meio da condução de reações de polimerização em suspensão;

<sup>2</sup> Na Reação 14 houve a síntese apenas das nanopartículas formadoras da casca, sendo conduzida apenas uma reação de polimerização em emulsão.

As diferentes condições operacionais de cada uma das reações, como razão mássica de estireno (S) /divinilbenzeno (DVB) empregada nas etapas de suspensão e emulsão, os instantes nos quais os componentes da emulsão eram alimentados, a vazão de alimentação de comonômeros e o tipo de material alimentado, são apresentadas na Tabela 3. As condições reacionais de referência foram estabelecidas em trabalhos anteriores (LENZI, 2002; LENZI *et al.*, 2003; BESTETI, 2011; PINTO, 2013).

### **2.2.3. Caracterização das Partículas Poliméricas**

Com o objetivo de caracterizar as partículas casca-núcleo produzidas ao final de cada reação, inúmeras análises foram realizadas: microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), cromatografia de permeação em gel (GPC), calorimetria exploratória diferencial (DSC), análise de distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento de luz, análise de área específica, diâmetro médio de poro e volume específico de poros por fisissorção de nitrogênio e análise de resistência mecânica. Análises de conversão e de rendimento também foram executadas. As partículas formadoras do látex, presentes no sobrenadante ao final da reação, também foram caracterizadas por análise de distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento de luz, cromatografia de permeação em gel (GPC) e teor de sólidos.

**Tabela 3.** Condições operacionais empregadas em cada uma das diferentes reações realizadas.

<b>Condição Operacional</b>				
Reação	Razão Mássica S / DVB	Instante Inicial de Alimentação da Emulsão (h)	Componentes Alimentados	Vazão de Alimentação Nominal (L/h)
1 (Polimerização em Suspensão)	3 / 1 (25% DVB)	0	0	0
2	3 / 1	2	Mistura de Comonômeros	0,035
3	3 / 1	2	Mistura de Comonômeros	0,082
4	3 / 1	2	Mistura de Comonômeros	0,127
5	3 / 1	2	Mistura de Comonômeros	0,017
6	3 / 1	2	Mistura de Comonômeros	0,039
7	3 / 1	2	Mistura de Comonômeros	0,071
8	3 / 1	1	Mistura de Comonômeros	0,069
9	19 / 1 (5% DVB)	2	Mistura de Comonômeros	0,069
10	3 / 1	2	Miniemulsão	0,069
11	3 / 1	0,67	Mistura de Comonômeros	0,069
12 (Polimerização em Suspensão)	3 / 1	0	0	0
13	3 / 1	2	Mistura de Comonômeros	0,069
14 (Polimerização em Emulsão)	3 / 1	0	Mistura de Comonômeros	0,069
15	3 / 1	0,67	Mistura de Comonômeros	0,069
16	3 / 2 (40% DVB)	0,67	Mistura de Comonômeros	0,069

### 2.2.3.1. Microscopia Óptica (MO)

Com o objetivo de analisar a morfologia das partículas casca-núcleo, análises de microscopia óptica foram realizadas. Foram empregados dois microscópios distintos.



Parte das amostras foi analisada em um microscópio óptico binocular (Nikon, modelo SMZ800, com capacidade de ampliação de 50 ×), equipado com câmera digital (Nikon Coolpix 995) acoplada, que viabilizava a ampliação e digitalização da imagem. Outra parte das partículas poliméricas foi caracterizada em um microscópio binocular (Axiovert 40 MAT, AxioCam MRC com capacidade de ampliação de 50 ×) também equipado com uma câmera digital (Nikon Coolpix 995), permitindo a ampliação e digitalização das imagens.

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

Para visualizar de forma mais acurada a superfície das partículas produzidas, foram usados dois microscópios eletrônicos de varredura. Parte das amostras foi analisada em um microscópio eletrônico, modelo Quanta 200 (Fei Company). Outra parte das partículas foi analisada em microscópio eletrônico, modelo Versa 3D (Fei Company). As análises foram conduzidas a alto vácuo e no modo de detecção de elétrons secundários, operando com tensão máxima de 30 kV. As fotomicrografias foram processadas em um analisador de imagens (Fei Company).

Uma etapa anterior à análise propriamente dita envolvia a metalização das amostras, fazendo-se o recobrimento das partículas com ouro, para tornar possível a visualização da superfície no microscópio. As amostras foram metalizadas no metalizador JFC 1500 (Jeol LTDA) As condições de operação para a aquisição das imagens, como tamanhos de “spot”, distância de trabalho (WD) e as ampliações das regiões fotografadas, estão presentes nas próprias micrografias, apresentadas na próxima seção.

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

Um dos métodos empregados para determinar a distribuição de massas molares das cadeias poliméricas e também os valores das massas molares médias é a cromatografia de permeação em gel (GPC) ou cromatografia por exclusão de tamanho (SEC). Essa análise envolve a permeação de uma solução polimérica por uma coluna recheada com gel poroso, ocorrendo a separação da massa polimérica em frações que apresentam diferentes tamanhos de cadeia.

Primeiramente, o polímero é dissolvido em um solvente específico, no qual deve ser completamente solúvel. A solução polimérica é, então, injetada na coluna que contém partículas porosas. Dessa forma, em função da presença de diferentes tamanhos de poros, as cadeias menores penetram nos interstícios dos inúmeros poros, requerendo maior volume de solvente para serem eluídas; em contrapartida, as cadeias de maior massa molar não conseguem penetrar nos pequenos poros, sendo eluídas mais rapidamente. Assim, as cadeias poliméricas são separadas de acordo com o volume hidrodinâmico que apresentam; ou seja, segundo o tamanho efetivo das cadeias em solução. É possível perceber que a faixa de separação de tamanhos é função do tamanho dos poros da coluna. Vale salientar ainda que, para determinar corretamente a distribuição das massas molares, é preciso selecionar corretamente as colunas e os solventes, uma vez que a coluna e o recheio não devem idealmente interagir com o polímero nem com o solvente utilizados (ODIAN, 2004).

As partículas poliméricas produzidas (tanto as partículas casca-núcleo quanto as presentes no sobrenadante) foram caracterizadas quanto à distribuição de massas molares e quanto às massas molares médias das cadeias poliméricas. Para isso, foi utilizado o cromatógrafo modelo GPC Max VE2001, fabricado pela Viscotek (equipado com uma coluna linear KF-804L e uma coluna linear KF-805L, cujos tamanhos máximos de poro eram de  $1,5 \cdot 10^3 \text{ \AA}$  e  $5 \cdot 10^3 \text{ \AA}$ , fornecidas pela Shodex, e um detector refratométrico Viscotek, modelo VE3580). O solvente tetrahidrofurano (THF) foi empregado como fase móvel e as análises foram conduzidas a  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Uma curva de calibração foi construída utilizando padrões de poliestireno, com massas molares na faixa de 2340 a  $1,8 \times 10^6 \text{ g/mol}$ .

Para analisar as partículas casca-núcleo produzidas, inicialmente eram pesados 0,015 g de cada amostra em tubos de vidro apropriados, onde eram adicionados em seguida 3 mL de THF, para solubilização de tais partículas. Após as partículas serem solubilizadas, seguia-se com a filtração das soluções poliméricas, utilizando membranas com diâmetro de poro de  $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ . Por fim, tais filtrados (aproximadamente  $300 \text{ }\mu\text{L}$ ) eram injetados no cromatógrafo.

A análise das partículas do sobrenadante seguiu o mesmo procedimento descrito para as partículas casca-núcleo, ocorrendo apenas uma etapa prévia de secagem do látex. Todas as análises de GPC apresentadas foram normalizadas (sinal normalizado entre 0 e 1), anulando qualquer possível efeito de variação da concentração de polímero na intensidade da resposta.

#### **2.2.3.4. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)**

Por meio da técnica de DSC (calorimetria exploratória diferencial) é possível avaliar a energia envolvida em transformações físicas ou químicas de substâncias, que resultam em liberação ou absorção de calor. Especificamente para os materiais poliméricos, uma curva de DSC típica apresenta três tipos básicos de transformações: transformações endotérmicas, como a fusão; transformações exotérmicas, como a cristalização; e transições de segunda ordem, como a transição vítrea (ODIAN, 2004). Essas transformações podem ser detectadas a partir de um processo de resfriamento e aquecimento, viabilizado por uma programação controlada da temperatura. A temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) é determinada no instante em que as cadeias poliméricas começam a apresentar mobilidade segmental. A temperatura de fusão ( $T_m$ ) é detectada quando ocorre a fusão das regiões cristalinas do polímero. A temperatura de cristalização ( $T_c$ ) está associada à cristalização das regiões amorfas do polímero, havendo o empacotamento organizado das cadeias poliméricas (CANEVAROLO, 2004).

Análises de DSC foram realizadas com o objetivo de identificar as temperaturas características das transições térmicas das partículas poliméricas casca-núcleo produzidas. Para isso, foi utilizado um equipamento modelo DSC 8500, cuja fabricante é a Perkin Elmer. Inicialmente, eram pesados aproximadamente 10 mg de cada amostra em cadinhos de alumínio que, em seguida, eram fechados e selados. Um cadinho de alumínio vazio era empregado como referência. Assim, um primeiro ciclo de aquecimento/resfriamento era realizado apenas para padronizar a história térmica das amostras. Os termogramas obtidos para as diferentes amostras são apresentados no *Apêndice B* as curvas em vermelho correspondem ao segundo ciclo de aquecimento/resfriamento. As análises foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio. A faixa de temperaturas estudada variou de 0 a 200 °C sendo que a taxa de resfriamento/aquecimento manteve-se constante e igual a 10 °C/min.

### **2.2.3.5. Área Específica, Diâmetro Médio de Poro e Volume Específico de Poros**

Com o objetivo de determinar a área específica, diâmetro médio de poro e volume específico de poros das partículas casca-núcleo, foi utilizado um analisador de superfície de materiais. A técnica é baseada na adsorção física de um gás sobre a superfície das partículas. Usualmente os gases empregados são nitrogênio ou argônio que, independentemente da composição do material sólido, adsorvem sobre a superfície das partículas. Esse processo de adsorção é decorrente da existência de forças de interação fracas (interações de *Van der Waals*) existentes entre as moléculas do gás e do sólido. Por meio desta técnica é possível determinar a correspondência existente entre a quantidade de gás adsorvida ou dessorvida por um material e a pressão relativa do gás, a uma temperatura constante; ou seja, é possível construir a chamada isoterma de adsorção/dessorção para o sólido analisado (TEIXEIRA, *et al.* 2001).

A partir da determinação da isoterma característica para um determinado material, modelos matemáticos podem ser usados com o objetivo de descrever de forma satisfatória tal isoterma (TEIXEIRA *et al.*, 2001). Vale destacar que, para sólidos microporosos (diâmetro de poro menor que 20 Å) e sólidos mesoporosos (diâmetro de poro na faixa de 20-500 Å, região na qual se encontram as partículas produzidas no presente trabalho), o modelo de Brunauer, Emmett e Teller (BET) pode ser empregado com êxito (SALIS *et al.*, 2003). Assim, ao utilizar o modelo BET e sabendo que para determinação da área específica das partículas é preciso haver a formação de uma monocamada de adsorvato sobre a superfície, consegue-se obter o valor numérico da área. Para determinar a distribuição dos diâmetros de poro e o volume específico de poros, o método BJH de Barret, Joyner e Halenda (BJH) pode ser considerado. Esse método é baseado na equação de Kelvin e considera que a queda da pressão do sistema é acompanhada pelo esvaziamento progressivo dos poros cheios de líquido (TEIXEIRA *et al.*, 2001).

Assim, para cada uma das amostras produzidas foram realizadas análises para determinação da área específica, do diâmetro médio de poro e do volume específico de poros. Uma etapa que antecedia cada uma das análises era a etapa de tratamento da amostra. Para isso, aproximadamente 1 g de amostra era pesado em um balão volumétrico que era, então, acoplado ao analisador de superfície (modelo ASAP 2020, fabricado pela empresa Micromeritics). Em seguida, o sistema era aquecido até a temperatura de 60 °C

sob vácuo, de forma a eliminar qualquer tipo de contaminante volátil ainda presente na superfície das partículas. Com o objetivo de determinar a exata massa seca de cada material sólido, o balão era novamente pesado. Após esta etapa, iniciava-se a análise propriamente dita (a duração completa desta análise dependia da área específica de cada material sólido): o balão volumétrico era novamente acoplado ao equipamento e imerso em um frasco de Dewar contendo N<sub>2</sub> líquido; o sistema de vácuo era ativado; em seguida, lentamente, gás N<sub>2</sub> era injetado para o interior do balão, possibilitando a adsorção do gás sobre a superfície das partículas; por fim, com o auxílio de programas computacionais, baseados no modelo e no método descritos anteriormente, as propriedades morfológicas dos suportes produzidos eram determinadas. Algumas das isotermas obtidas são apresentadas no *Apêndice C*.

#### **2.2.3.6. Distribuição de Tamanhos de Partícula**

Para a determinação da distribuição de tamanhos das partículas ainda presentes no látex ao final de cada reação, empregou-se uma técnica baseada no espalhamento de luz provocado pelo movimento Browniano das partículas em suspensão. Assim, a partir de relações matemáticas bem estabelecidas, é possível determinar a distribuição de tamanhos das partículas do sobrenadante. Foi utilizado, então, um analisador de tamanho de partículas na faixa de (0,3 nm - 10 µm), modelo Zetasizer Nano-ZS, fornecido pela Malvern Instruments.

A análise era realizada a partir da adição de uma gota de cada amostra, sem tratamento prévio, a uma cubeta de vidro de 4 ml. Em seguida, a cubeta era preenchida com água destilada e inserida no equipamento. Os gráficos de distribuição de tamanhos eram, então, obtidos. Vale ressaltar que, para cada amostra, a análise foi realizada em triplicata.

Uma técnica semelhante foi empregada para a determinação da distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo. Tal técnica também se baseia no espalhamento de luz provocado pela presença das partículas poliméricas. Por meio da detecção dos raios refletidos, é possível determinar a distribuição de tamanhos das partículas. Foi usado, então, um analisador de tamanhos de partícula na faixa de 0,02 µm a 2000 µm, modelo Master Sizer Hydro 2000S, fornecido pela empresa Malvern Instruments.

Para realização desta análise, inicialmente as partículas com morfologia casca-núcleo eram colocadas em um compartimento do equipamento, contendo uma solução de água e etanol. Um sistema de agitação presente no equipamento promovia a dispersão e a homogeneização das partículas poliméricas na solução alcoólica. Com o auxílio de uma bomba, parte desta solução era encaminhada até o leitor. Assim, a partir de relações matemáticas, os gráficos de distribuição de tamanhos eram gerados. Todas as amostras também foram analisadas em triplicata.

### ***2.2.3.7. Análise de Resistência Mecânica***

Após inúmeras buscas na literatura, a fim de identificar uma metodologia apropriada para avaliar a resistência mecânica das partículas com morfologia casca-núcleo, pôde-se perceber que não havia uma técnica estabelecida para tal fim. A maior parte das análises encontradas que objetivavam determinar a resistência mecânica dos materiais poliméricos envolvia etapas preliminares de prensagem ou fusão. No entanto, tais tratamentos destruiriam a morfologia das partículas casca-núcleo.

Assim, para avaliar a resistência mecânica dos suportes poliméricos, uma metodologia foi adotada pelo grupo. As partículas eram previamente lavadas com etanol e com água destilada, seguindo o procedimento adotado na etapa de imobilização enzimática, que será apresentada no próximo capítulo. Em seguida, tais partículas eram vertidas em um mini-reator, com capacidade de 200 mL, contendo água destilada. É importante mencionar que a razão existente entre a massa de polímero (10 g) e a massa de água destilada (100 g) foi igual à empregada durante o procedimento de imobilização, como mostrado no próximo capítulo. As partículas eram dispersas, então, no meio aquoso e o sistema era mantido sob agitação por seis horas, período necessário para adsorção de praticamente toda a carga enzimática adicionada no início do processo de imobilização (para a maior parte dos suportes avaliados) (PINTO, 2013). Foram analisadas três velocidades de agitação distintas: 200 rpm (mais próxima de valor empregado nas reações em que os biocatalisadores foram utilizados), 400 rpm e 800 rpm. Dessa forma, ao longo de todo o período mencionado, eram retiradas alíquotas ( $t = 0, 1 \text{ h}, 2 \text{ h}, 3 \text{ h}, 6 \text{ h}$ ) (aproximadamente 2 mL cada) para posterior determinação da distribuição de tamanhos das partículas dispersas no meio.

A partir de tal técnica, buscou-se identificar os suportes casca-núcleo mais resistentes mecanicamente, cujos gráficos de distribuição de tamanhos eram mantidos inalterados ao longo do tempo; e os suportes menos resistentes, cujos gráficos de distribuição de tamanhos eram deslocados ao longo do tempo na direção de menores diâmetros.

### ***2.2.3.8. Determinação da Conversão, do Rendimento da Reação e do Teor de Sólidos***

A partir da realização de análises gravimétricas, foi possível acompanhar a evolução cinética de cada uma das reações, determinar o teor de sólidos presentes no sobrenadante ao final de cada reação e obter o rendimento correspondente a cada reação.

Como mencionado anteriormente, alíquotas foram retiradas em cada uma das reações, possibilitando o acompanhamento da conversão ao longo do tempo. Cada uma dessas alíquotas era vertida em uma espécie de copo de alumínio, contendo aproximadamente 5 gotas de solução aquosa de hidroquinona (1% m/m) (0.5 g de hidroquinona e 49.5g de água destilada). Tais amostras permaneciam, então, na estufa de circulação a 40 °C, até apresentarem massas constantes. As equações utilizadas para o cálculo da conversão em cada ponto de amostragem são mostradas no *Apêndice A*.

Para calcular o rendimento correspondente a cada reação, empregou-se a Equação 1. É possível notar que, para tal cálculo, comparou-se a massa de polímero obtida ao final da etapa de secagem com a massa da mistura monomérica total (soma das massas dos comonômeros) adicionada no início da reação, o que pressupõe a amostragem homogênea e uniforme do meio reacional.

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

**Equação 1.** Cálculo do rendimento.

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

Por fim, o cálculo do teor de sólidos é mostrado na Equação 2. Para a realização de tal análise, aproximadamente 10 mL da solução do sobrenadante eram adicionados a um béquer contendo aproximadamente 10 gotas (menos de 1 mL) de solução de hidroquinona (1% m/m). Essas amostras eram colocadas na estufa de circulação a 40 °C, até que suas massas apresentassem valores constantes. Vale salientar que cada amostra foi analisada em triplicata.

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

**Equação 2.** Cálculo do teor de sólidos.

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

### 2.3. Resultados em Escala Bancada

O objetivo da presente seção é apresentar os resultados referentes à caracterização das partículas poliméricas casca-núcleo obtidas em escala de bancada. Como mencionado anteriormente, diferentes reações foram realizadas e, em seguida, cada um dos suportes foi caracterizado por meio da execução das diferentes análises apresentadas na seção anterior. É importante ressaltar que esta etapa do trabalho envolveu três grupos de experimentos distintos, resultando em três subseções diferentes. Na **Seção 2.3.1**, primeiro bloco de experimentos, foi avaliada a influência da vazão de alimentação de monômeros sobre a morfologia final das partículas casca-núcleo. Na **Seção 2.3.2**, foram produzidas partículas do núcleo, nanopartículas formadoras da casca e as partículas casca-núcleo propriamente ditas, visando-se especificamente a caracterizar cada uma dessas partículas poliméricas e a avaliar a influência de cada uma na síntese de biocatalisadores (resultados que serão apresentados no **Capítulo III**). A partir dos resultados obtidos, foi proposto um terceiro bloco de experimentos, apresentados na **Seção 2.3.3**, em que diferentes



estratégias foram adotadas, buscando-se sintetizar suportes com áreas específicas e porosidades ainda mais pronunciadas.

### ***2.3.1. Influência da Vazão de Alimentação de Comonômeros na Morfologia das Partículas Casca-núcleo***

Um primeiro bloco de experimentos foi realizado com o objetivo inicial de avaliar a influência da vazão de alimentação de comonômeros sobre a morfologia final das partículas produzidas e verificar se os resultados encontrados por PINTO (2013) independiam da composição química do sistema. PINTO (2013) percebeu que a variável que mais afetava a morfologia de partículas casca-núcleo à base de poliestireno era a vazão de alimentação de monômero durante a etapa de emulsão alimentada. Notou também que havia uma janela operacional em que era possível a síntese de partículas casca-núcleo individualizadas (vazões de alimentação na faixa de operação 0,082 - 0,12 L/h, por exemplo, provocavam um descontrole do sistema de polimerização e a formação de grandes aglomerados). Percebeu-se também que havia uma vazão ótima que resultava na produção de partículas com áreas específicas máximas. Assim, surgiu a necessidade de avaliar se o sistema polimérico seria afetado da mesma forma por essa variável operacional, independentemente de sua composição química.

Nesse contexto, inúmeros experimentos foram realizados, empregando condições operacionais similares às usadas por PINTO (2013), mas à base de outros comonômeros (uma mistura de estireno (75 % m/m) e divinilbenzeno (25 % m/m)). Essa composição química foi selecionada, porque resultou em suportes poliméricos eficazes para a síntese de biocatalisadores com maiores área específica e porosidade, de acordo com o estudo realizado por CUNHA *et al.* (2014). As condições operacionais de cada uma das reações foram apresentadas nas Tabelas 1, 2 e 3. É importante ressaltar que a vazão de alimentação precisou ser ajustada ao longo de cada uma das reações, de forma a apresentar na média valor tão próximo quanto possível do valor almejado. Assim, na Tabela 4 são apresentadas as vazões teóricas, idênticas às empregadas no trabalho realizado por PINTO (2013), e as vazões médias reais correspondentes a cada uma das reações realizadas.

Vale salientar que os erros experimentais mostrados na Tabela 4 foram calculados com dados de aferição de reações conduzidas sob um mesmo valor de vazão nominal. É

importante mencionar também que os erros experimentais presentes na Tabela 4, assim como os demais erros que serão mostrados nas demais tabelas e gráficos ao longo desta seção, foram calculados a partir da multiplicação do desvio padrão (encontrado para cada um dos conjuntos de dados que apresentavam mesmo valor nominal) por dois, uma vez que foram consideradas distribuições normais com 95 % de confiança para tais erros experimentais (SCHWAAB e PINTO, 2007).

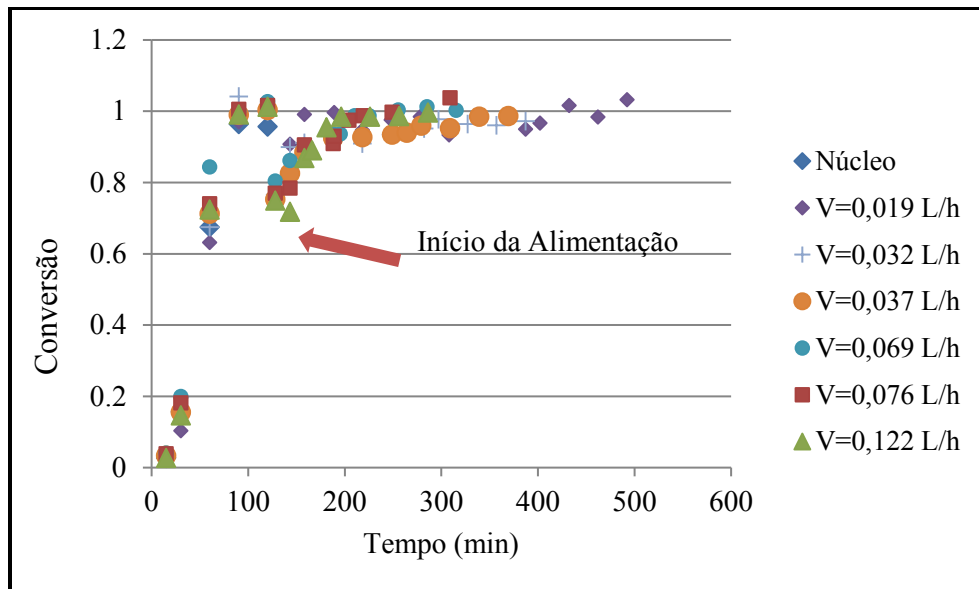
**Tabela 4.** Vazão de alimentação da mistura monomérica correspondente a cada uma das diferentes reações realizadas no primeiro bloco de experimentos.

<b>Condição Operacional</b>			
Reação	Legenda	Vazão de Alimentação Nominal (L/h)	Vazão de Alimentação Real (L/h)
1	Núcleo	0	0
2	V=0,019 L/h	0,017	0,019 ± 0,006
3	V=0,032 L/h	0,035	0,032 ± 0,006
4	V=0,037 L/h	0,039	0,037 ± 0,006
5	V=0,069 L/h	0,071	0,069 ± 0,006
6	V=0,076 L/h	0,082	0,076 ± 0,006
7	V=0,122 L/h	0,127	0,122 ± 0,006

### **2.3.1.1. Análise Cinética e Rendimento**

Como mencionado anteriormente, a cinética de polimerização correspondente a cada uma das reações realizadas foi determinada, como mostrado na Figura 7. Nota-se que as cinéticas de polimerização das diferentes reações foram similares, o que já era esperado, uma vez que a única diferença existente entre os diferentes experimentos realizados era a vazão de alimentação da carga monomérica. Como as reações são relativamente rápidas (elevadas conversões em instantes relativamente curtos de reação, atingindo aproximadamente 100 % de conversão ao final de cada reação), apesar da mistura de monômeros ser alimentada com velocidade mais intensa em algumas reações, ainda assim os comportamentos cinéticos são semelhantes. Pode-se observar também uma queda das conversões no início da etapa de alimentação da mistura monomérica, diminuição esta provocada pela adição sequencial dos inúmeros componentes da emulsão ao sistema, incluindo a carga inicial de monômeros.

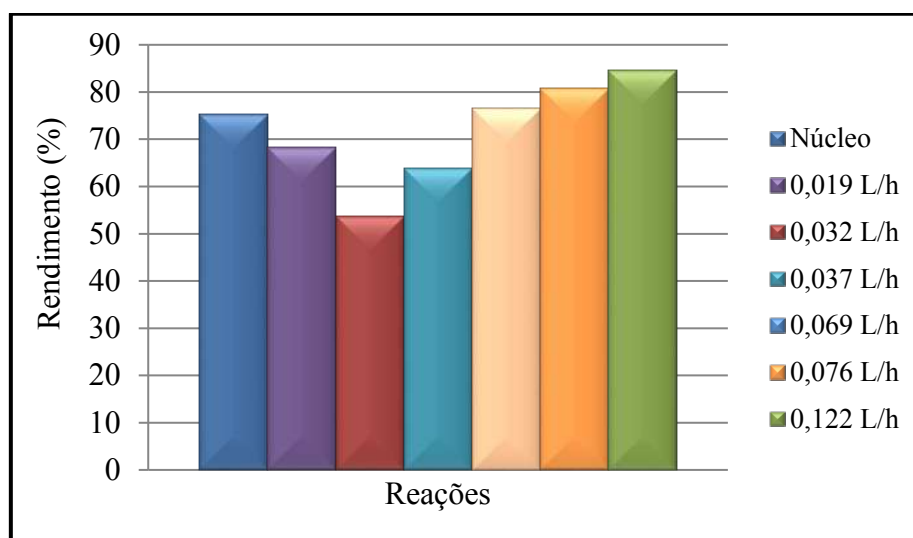
Ao comparar os resultados obtidos com os encontrados por PINTO (2013), nota-se que a adição de DVB provoca um aumento pronunciado no valor das conversões, mesmo nos instantes iniciais de amostragem. Além disso, a faixa de vazão máxima encontrada por PINTO (2013) não resultou em aglomerações pronunciadas quando DVB foi adicionado ao sistema. Assim, percebe-se que a composição química afeta de forma pronunciada tanto a cinética do sistema de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, quanto os valores viáveis das variáveis operacionais para uma condução satisfatória da reação. Dessa forma, parece claro que a janela operacional de viabilidade do processo deve ser reavaliada para cada sistema químico particular estudado, o que constitui uma conclusão importante para a implementação real desses sistemas de reação.



**Figura 7.** Análise cinética de cada uma das reações de polimerização realizadas.

Ao final do processo de secagem dos suportes poliméricos, o rendimento correspondente a cada reação foi determinado, comparando-se a massa final de suporte produzido com a massa de monômeros empregada no início da reação. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 8. Pôde-se notar que o rendimento do núcleo polimérico esteve em torno de 70 %, valor semelhante ao obtido para as reações nas quais apenas estireno foi empregado (PINTO, 2013). Ou seja, a adição do divinilbenzeno aparentemente não afetou a quantidade de material polimérico produzido, apesar de provocar um aumento na velocidade da reação de polimerização. Ao analisar os resultados correspondentes às partículas casca-núcleo, percebe-se que ocorreu um

aumento do rendimento para a reação conduzida com menor vazão (0,019 L/h), possivelmente em decorrência do maior tempo para aglomeração das partículas emulsificadas ao redor dos núcleos poliméricos. No entanto, a partir da vazão de 0,032 L/h, nota-se que o aumento da vazão foi acompanhado pelo aumento do rendimento. Provavelmente, com o aumento da vazão a partir desta região de mínimo rendimento, ocorre uma possível instabilidade da emulsão, acarretando em aumento da aglomeração das partículas emulsificadas e conseqüente aumento no rendimento das reações.

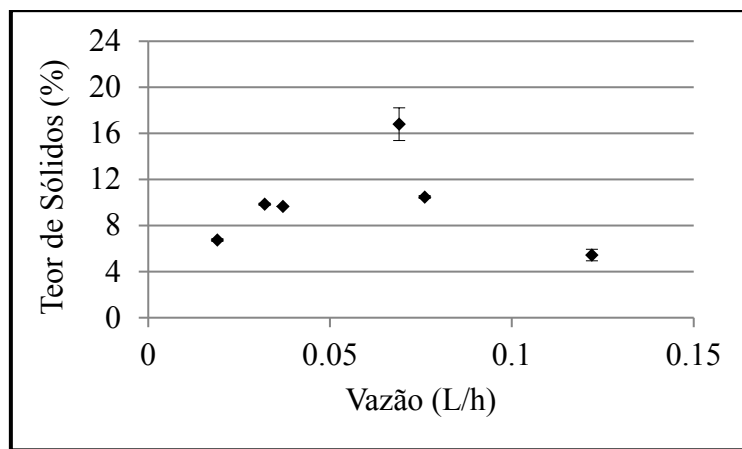


**Figura 8.** Rendimento de cada uma das reações realizadas.

### 2.3.1.2. Análises do Látex

O látex, composto por partículas que permanecem dispersas no sobrenadante, foi recolhido ao final de cada reação, possibilitando a caracterização dessas partículas emulsificadas. Inicialmente foi determinado o teor de sólidos ainda presentes na emulsão ao final da reação de polimerização. Os resultados obtidos são apresentados na Figura 9. O teor de sólidos obtido ao final da reação 1, em que apenas partículas de núcleo foram sintetizadas, não está mostrado na figura, mas correspondeu a apenas 2 % (m/m) do sobrenadante coletado. Este valor baixo era esperado, uma vez que apenas uma reação em suspensão foi conduzida. Sabe-se, contudo, que mesmo em reações conduzidas em suspensão, como uma pequena parte do iniciador é solúvel na fase aquosa, assim como parte pequena dos monômeros empregados, pode também ocorrer em menor extensão algum grau de polimerização em emulsão, por nucleação homogênea (ODIAN, 2004).

Ao analisar os demais resultados encontrados, percebe-se que houve um aumento e uma queda no teor de sólidos com o aumento da vazão. Esse comportamento é compatível com os encontrados por PINTO (2013), uma vez que o aumento da vazão é acompanhado por um menor tempo para o recobrimento das partículas do núcleo, restando maior número de partículas no sobrenadante ao final da reação. A partir de uma dada vazão (em torno de 0,069 L/h), observa-se uma queda no teor de sólidos do sobrenadante (queda mais pronunciada na reação em que foi empregada maior vazão de alimentação,  $V=0,122$  L/h), provavelmente em função de uma desestabilização da emulsão, resultando em maior aglomeração das partículas.

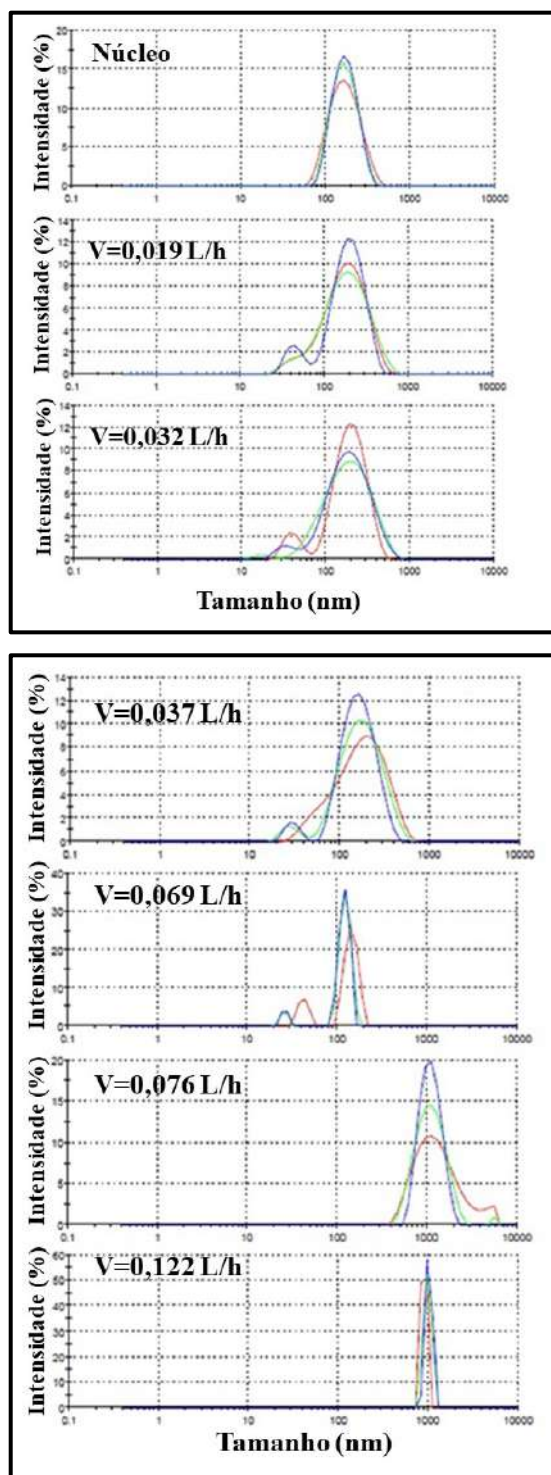


**Figura 9.** Teor de sólidos presentes no látex ao final de cada uma das reações realizadas.

Ao comparar os resultados obtidos, percebe-se que há uma correspondência entre o teor de sólidos presentes no sobrenadante e o rendimento final de cada reação. Esse comportamento é observado porque, quanto maior é o teor de partículas emulsificadas, menor é a eficiência no recobrimento dos núcleos, sendo menor a massa de suporte obtida ao final da reação. A mesma correlação foi observada por PINTO (2013).

A distribuição de tamanhos das partículas do sobrenadante também foi avaliada e é apresentada na Figura 10. Pode-se perceber que o aumento da vazão foi acompanhado por um deslocamento das curvas de distribuição de tamanhos para diâmetros maiores. Em função da possível maior desestabilização da emulsão em vazões mais pronunciadas, há maior aglomeração das partículas emulsificadas, resultando em um aumento do diâmetro das mesmas. O diâmetro médio das partículas presentes no sobrenadante ao final de cada reação também foi comparado e são mostrados na Tabela 5. É possível notar que, assim

como pôde ser observado na Figura 10, o diâmetro médio das partículas do látex aumentou com o aumento da vazão, corroborando a análise realizada anteriormente.



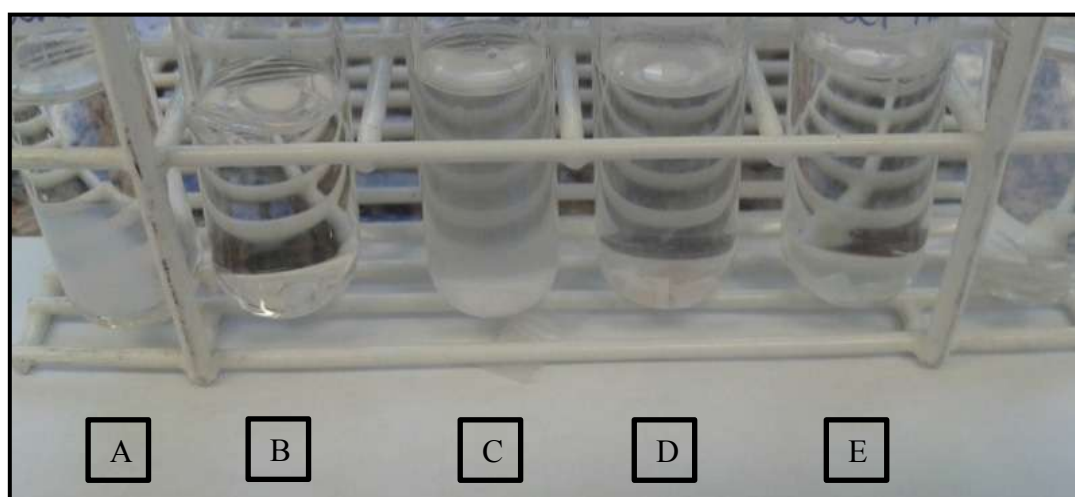
**Figura 10.** Distribuição de tamanhos das partículas do sobrenadante correspondente a cada reação.

**Tabela 5.** Diâmetro médio das partículas presentes no sobrenadante ao final de cada uma das reações realizadas.

Reação	Vazão (L/h)	Diâmetro Médio (nm)
1	- <sup>1</sup>	156,2 ± 4,3
2	0,019	140,7 ± 0,7
3	0,032	143,7 ± 1,7
4	0,037	133,2 ± 0,8
5	0,069	1296,3 ± 140,0
6	0,076	1147,0 ± 67,2
7	0,122	5446,7 ± 1909,7

<sup>1</sup> Reação em suspensão para síntese dos núcleos poliméricos.

As partículas do látex também foram avaliadas quanto à distribuição de massas molares das cadeias poliméricas. Contudo, não foi possível realizar tal análise, uma vez que as partículas não foram solúveis no solvente padrão empregado (THF), indicando que as mesmas encontravam-se reticuladas, como pode ser observado na Figura 11. É largamente discutida na literatura a utilização do divinilbenzeno (um monômero dieno, com duas ligações duplas) como agente reticulante em reações de copolimerização (ODIAN, 2004). Assim, a depender da concentração de DVB no meio reacional, as cadeias poliméricas tornam-se extremamente reticuladas, não sendo possível a solubilização para posterior análise cromatográfica.



**Figura 11.** Partículas emulsificadas não solubilizadas em THF: (A) V=0,019 L/h; (B) V=0,032 L/h; (C) V=0,069 L/h; (D) V=0,076 L/h; (E) V=0,122 L/h.

### **2.3.1.3. Temperatura de Transição Vítrea**

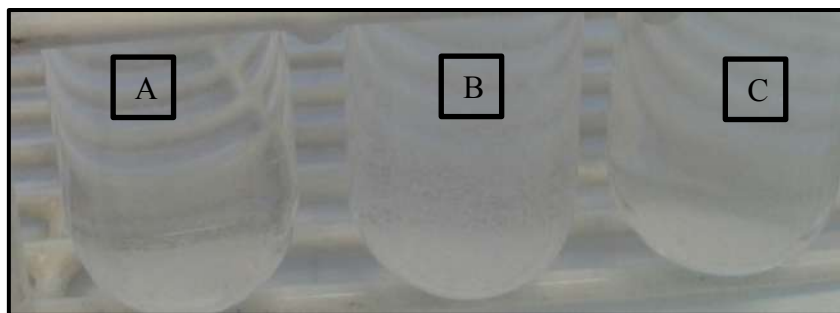
As partículas com morfologia casca-núcleo também foram avaliadas quanto às temperaturas em que ocorrem as transições térmicas características. Como pode ser observado nos gráficos apresentados no *Apêndice B*, não foi possível identificar as temperaturas de transição vítrea dos diferentes polímeros produzidos. Como mencionado anteriormente, a adição de concentrações elevadas de divinilbenzeno ao meio reacional provoca a reticulação das cadeias poliméricas, impossibilitando a determinação da temperatura de transição vítrea (Tg). Esse resultado corrobora o estado reticulado das cadeias, já identificado por meio da insolubilidade das amostras do sobrenadante em THF. Contudo, ressalta-se que BESTETI (2011) obteve valores de Tg igual a 100,9 °C para partículas sintetizadas em condições reacionais semelhantes (contendo mesmo teor de DVB no meio reacional), o que pode indicar a produção de partículas com diferentes graus de reticulação nos dois estudos. Possivelmente, variações no grau de pureza dos monômeros, principalmente no grau de pureza do divinilbenzeno, provocaram essa alteração no grau de reticulação das cadeias poliméricas.

### **2.3.1.4. Distribuição das Massas Molares das Partículas Casca-núcleo**

Análises para determinação da distribuição das massas molares das cadeias poliméricas das partículas casca-núcleo também foram realizadas. Contudo, novamente não foi possível solubilizar qualquer das amostras produzidas no solvente empregado (THF). Assim, tal resultado reforça os resultados obtidos anteriormente sobre o efeito reticulante do comonômero divinilbenzeno. Na Figura 12 é possível observar as partículas casca-núcleo, dispersas em THF. Algumas partículas apresentaram certo grau de inchamento e aglomeração, mas não solubilizaram.

Esse resultado ressalta a elevada resistência química das partículas produzidas, uma vez que, mesmo imersas em um solvente amplamente empregado para solubilização de materiais poliméricos, não apresentaram solubilidade. Além disso, reforça o potencial emprego de tais partículas para a produção de biocatalisadores, para uso em reações de síntese orgânica, já que, como mostrado, é baixo o risco de haver comprometimento das propriedades morfológicas dos suportes nesses meios reacionais.





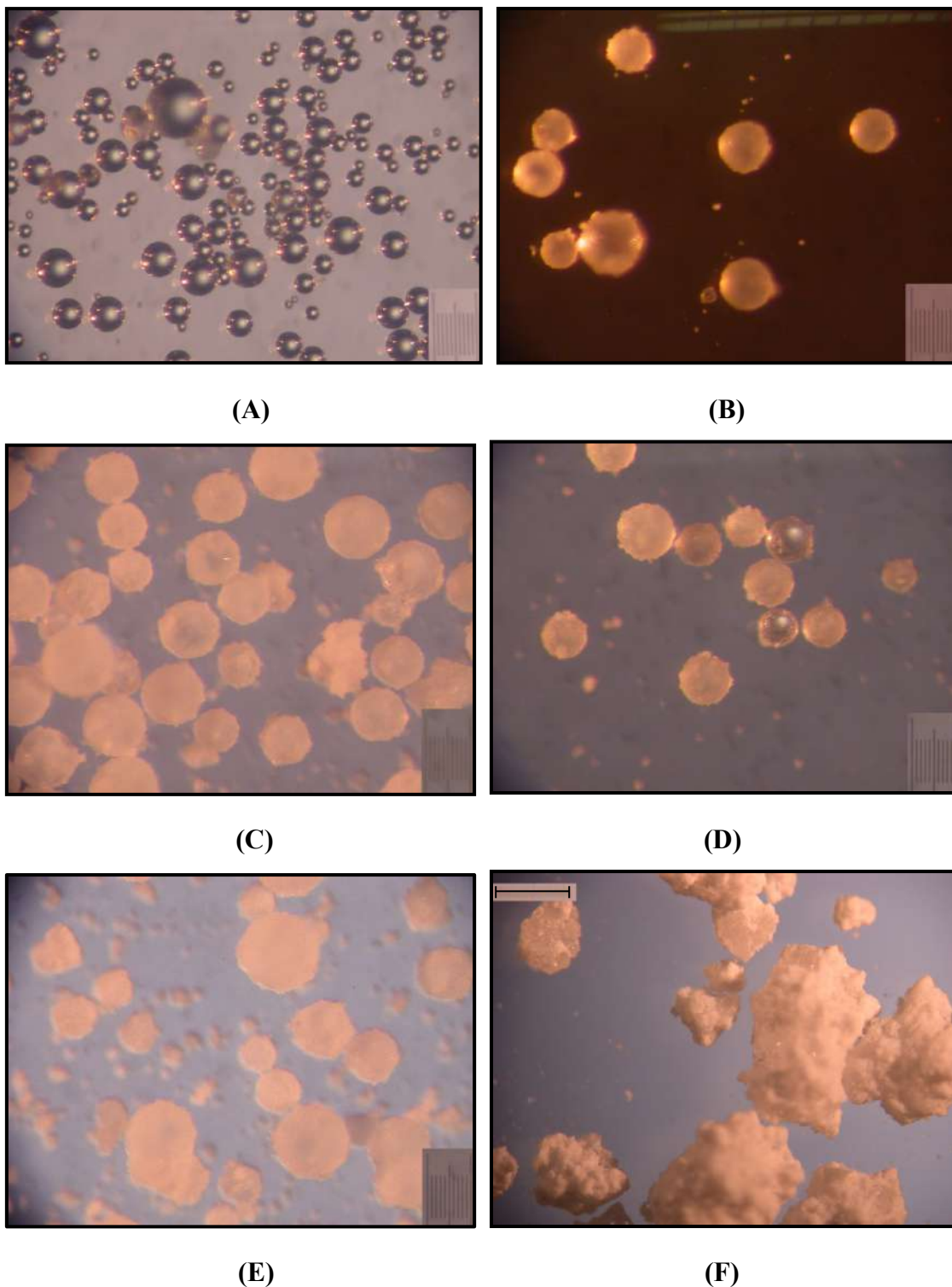
**Figura 12.** Partículas casca-núcleo não solubilizadas em THF: (A)  $V=0,069$  L/h; (B)  $V=0,076$  L/h; (C)  $V=0,122$  L/h.

### 2.3.1.5. *Morfologia das Partículas Casca-núcleo*

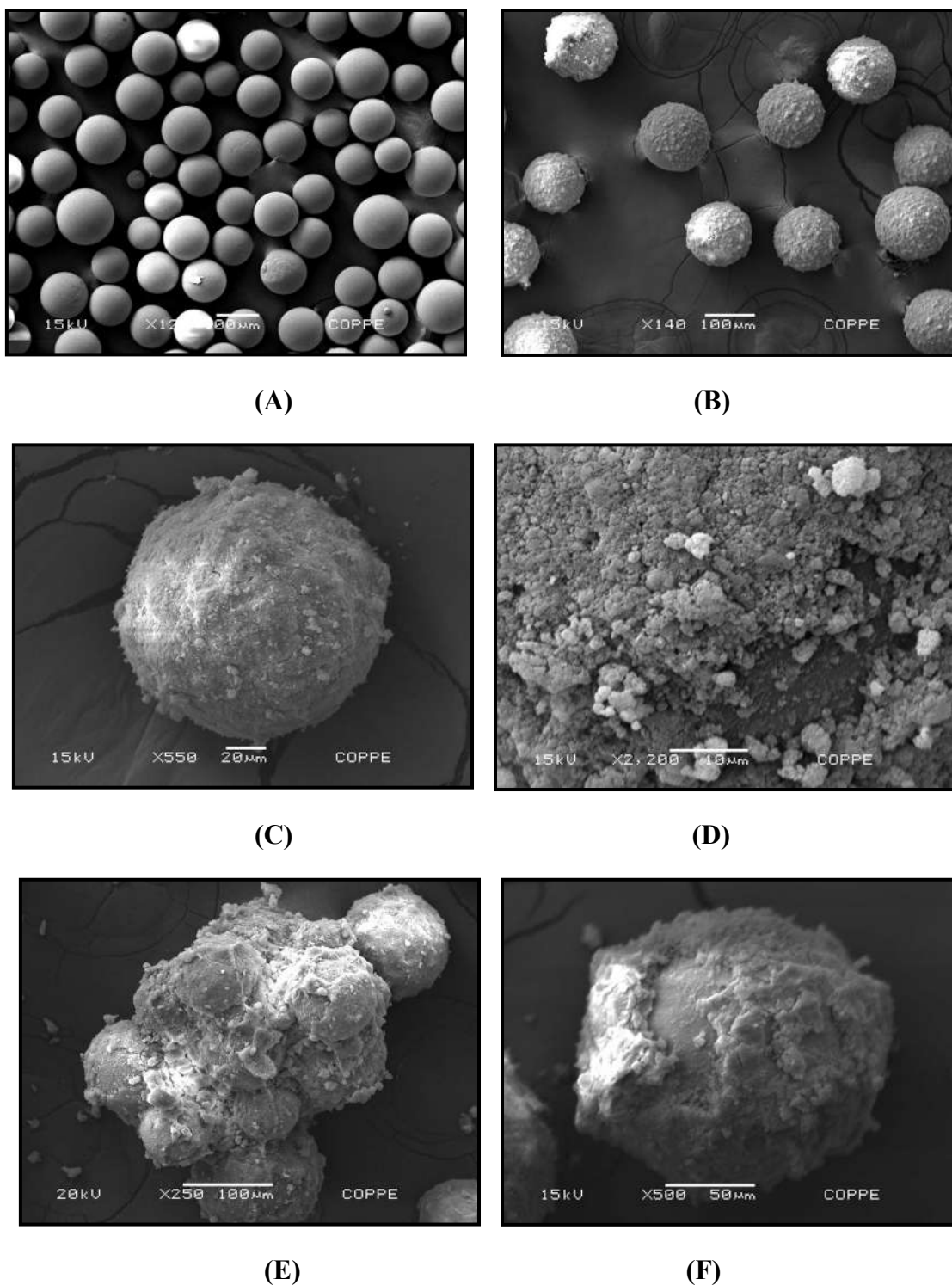
A morfologia das partículas produzidas pôde ser determinada a partir de análises de microscopia óptica. As micrografias de algumas das partículas casca-núcleo sintetizadas são mostradas na Figura 13. Vale destacar que para todas as Figuras o comprimento da régua corresponde a  $100\ \mu\text{m}$ . Apenas para a Figura F, o comprimento da régua é de  $1000\ \mu\text{m}$ .

É possível observar que o núcleo de PS-co-DVB apresenta morfologia esférica com diâmetro de partícula em torno de  $100\ \mu\text{m}$ . As partículas casca-núcleo também apresentam aspecto esférico com diâmetros de aproximadamente  $100\ \mu\text{m}$ . Ao comparar as Figura 13 D e 13 F, nota-se que a adição de divinilbenzeno no sistema provocou redução considerável no grau de aglomeração das partículas, uma vez que ambas foram sintetizadas empregando as mesmas condições operacionais, com vazões de alimentação semelhantes, diferindo apenas em relação à composição química do sistema.

Com o objetivo de obter uma análise mais detalhada da superfície das partículas produzidas, análises de microscopia eletrônica também foram realizadas e são apresentadas na Figura 14. É possível observar na Figura 14 A a superfície sólida e lisa dos núcleos. Nas Figuras 14 B, 14 C e 14 F, é possível notar a superfície esférica e irregular das partículas com morfologia casca-núcleo. A casca polimérica formada sobre os núcleos é mostrada com mais detalhe na Figura 14 D, sendo observadas as partículas emulsificadas aglomeradas ao redor dos núcleos. Na Figura 14 E é apresentado um aglomerado polimérico, formado a partir da junção de diversos núcleos. Esses aglomerados são muito comuns em reações à base apenas de poliestireno (PINTO, 2013), mas também podem ocorrer na presença de divinilbenzeno, como mostrado na figura.

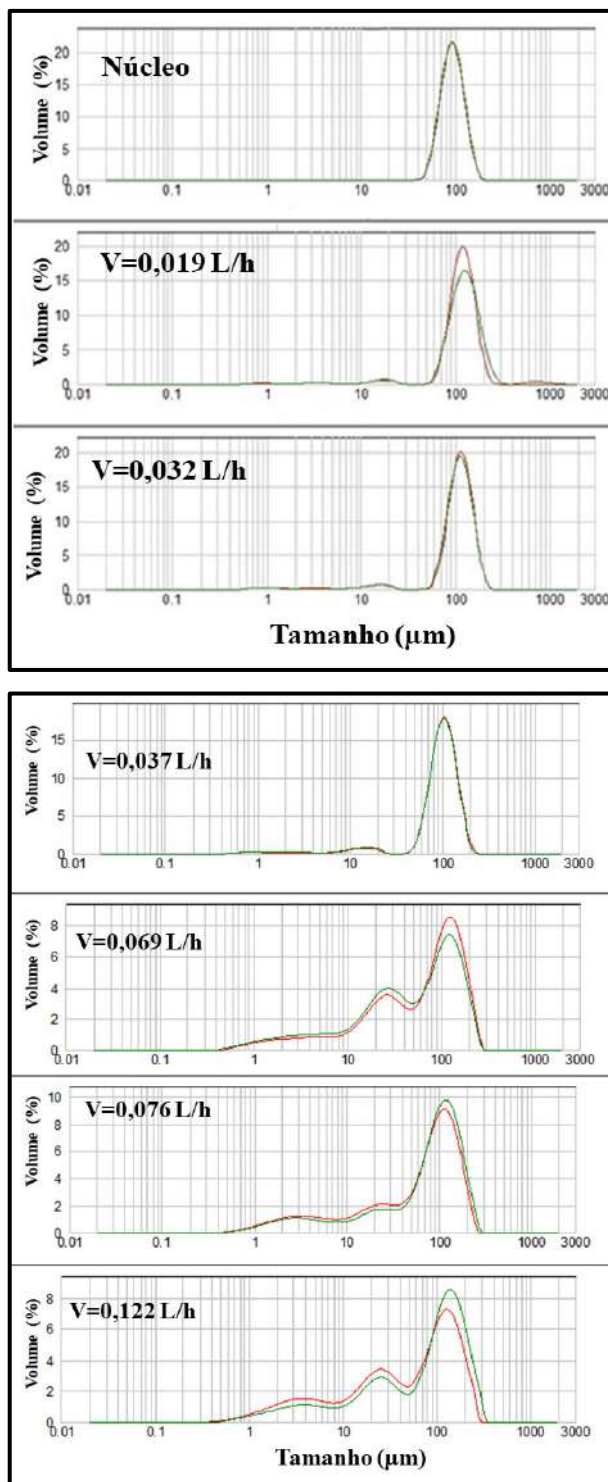


**Figura 13.** Micrografias das partículas casca-núcleo produzidas a partir das diferentes condições operacionais: **(A)** PS-co-DVB (núcleo); **(B)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,032$  L/h); **(C)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,019$  L/h); **(D)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,037$  L/h); **(E)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,069$  L/h); **(F)** PS/PS (casca-núcleo à base apenas de poliestireno;  $V=0,035$  L/h; *Fonte: PINTO, 2013*).



**Figura 14.** Micrografias eletrônicas das partículas produzidas a partir das diferentes condições operacionais: **(A)** PS-co-DVB (núcleo); **(B)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,032$  L/h); **(C)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,076$  L/h); **(D)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,122$  L/h); **(E)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,019$  L/h); **(F)** PS-co-DVB/PS-co-DVB (casca-núcleo;  $V=0,069$  L/h).

Em seguida, foram avaliadas as distribuições de tamanhos das partículas produzidas. A Figura 15 apresenta o efeito do aumento da vazão sobre a distribuição de tamanhos de partículas casca-núcleo.



**Figura 15.** Distribuição de tamanhos das partículas com morfologia casca-núcleo.

A partir da análise da Figura 15, é possível notar que, para as partículas do núcleo, foram obtidas curvas monomodais, com diâmetro de partículas em torno de 100  $\mu\text{m}$ , como já havia sido observado nas micrografias. O aumento da vazão aparentemente provoca aumento tanto das partículas de maior tamanho quanto das de menor diâmetro. Provavelmente, a maior instabilidade da emulsão, causada pelo aumento da vazão, provoca maior aglomeração das partículas em emulsão, havendo um aumento de partículas de menor diâmetro. Além disso, há também um aumento da aglomeração das partículas produzidas, resultando em partículas com maiores diâmetros.

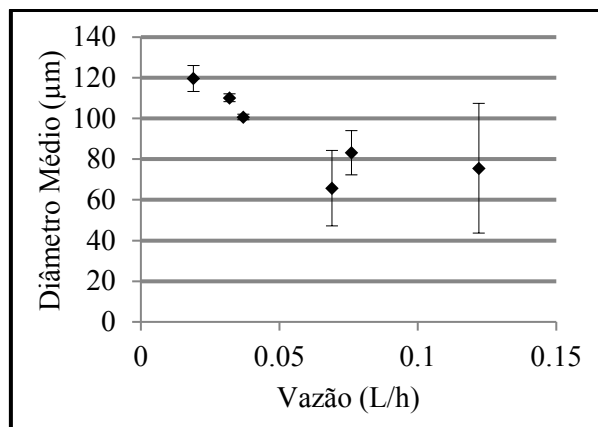
Esse resultado também pode ser observado ao analisar os diâmetros médios das partículas casca-núcleo, mostrados na Tabela 6. A queda do diâmetro médio com o aumento da vazão é evidenciada na Figura 16. Possivelmente essa queda é decorrente da desestabilização da emulsão e da maior aglomeração das partículas nanométricas emulsificadas.

**Tabela 6.** Diâmetro médio das partículas casca-núcleo produzidas no primeiro bloco de experimentos.

Reação	Vazão (L/h)	Diâmetro Médio d50 ( $\mu\text{m}$ )
01	- <sup>1</sup>	92,2 $\pm$ 1,1
05	0,019	119,7 $\pm$ 6,4
02	0,032	110,2 $\pm$ 1,9
06	0,037	100,8 $\pm$ 1,4
07	0,069	65,8 $\pm$ 18,6
03	0,076	83,2 $\pm$ 10,9
04	0,122	75,6 $\pm$ 31,9

<sup>1</sup> Reação em suspensão para síntese dos núcleos poliméricos.

Por fim, as partículas foram caracterizadas quanto à área específica, ao diâmetro médio de poro e ao volume específico de poros. Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 7. Com o objetivo de facilitar a compreensão em relação à influência da vazão de alimentação sobre cada uma das propriedades morfológicas mencionadas, é mostrada a Figura 17. Para estabelecer um efeito comparativo com sistemas em que apenas estireno foi empregado, os resultados encontrados para as partículas casca-núcleo de poliestireno, obtidos por PINTO (2013), também são apresentados.



**Figura 16.** Influência da vazão no diâmetro médio das partículas com morfologia casca-núcleo.

**Tabela 7.** Características morfológicas das partículas casca-núcleo produzidas no primeiro bloco de experimentos.

Reação	Vazão (L/h)	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)	Volume Médio de Poros (cm <sup>3</sup> /g)	Diâmetro Médio de Poro (Å)
1	- <sup>1</sup>	0,0025	- <sup>2</sup>	- <sup>2</sup>
5	0,019	21,5	0,11	210,5
2	0,032	11,2	0,07	241,1
6	0,037	13,7	0,08	237,4
7	0,069	33,4	0,16	197,2
3	0,076	32,1	0,17	211,4
4	0,122	23,5	0,14	246,9

<sup>1</sup> Reação em suspensão para síntese dos núcleos poliméricos;

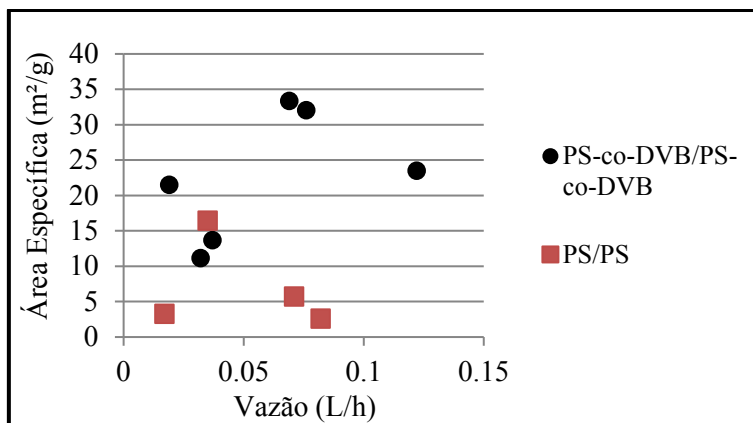
<sup>2</sup> Valores não puderam ser detectados pelo equipamento.

A partir da análise da Figura 17 A, é possível notar que existe uma faixa para a vazão de alimentação (0,05 – 0,1 L/h) que resulta em valores máximos de área específica. Possivelmente a diminuição pronunciada da vazão proporciona um maior tempo para o recobrimento dos núcleos (resultando em menores teores de sólidos no látex, maiores rendimentos e maiores áreas específicas), comportamento observado quando a vazão de 0,019 L/h foi empregada. Contudo, também provoca, aparentemente, maior estabilização das partículas emulsificadas, resultando em menores recobrimentos do núcleo e originando suportes com menores áreas específicas (0,032 – 0,037 L/h). Além disso,

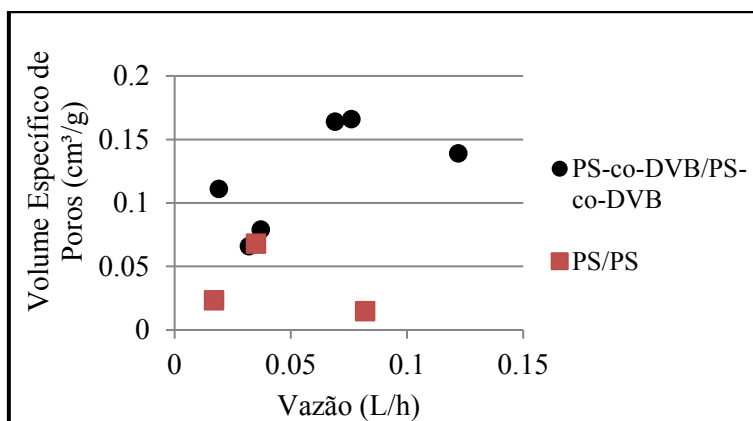
como mencionado anteriormente, o aumento expressivo da vazão provoca maior desestabilização da emulsão, causando maior aglomeração das partículas (tanto das casca-núcleo quanto das emulsificadas) e uma queda na área específica. Ao analisar os resultados obtidos por PINTO (2013), percebe-se que um comportamento semelhante foi obtido para reações à base de estireno. Contudo, a faixa de vazão que resulta em partículas com áreas específicas mais pronunciadas foi deslocada para vazões menores. Além disso, a redução dos valores das áreas específicas obtidas é evidenciada. Dessa forma, percebe-se que a adição de divinilbenzeno ao sistema altera os valores absolutos de área específica e as faixas ótimas de vazão. No entanto, o comportamento qualitativo do sistema foi mantido, independentemente da composição química.

Resultados que corroboram tal análise são mostrados nas Figuras 17 B e 17 C. A mesma faixa ótima de vazão que possibilitou a obtenção de suportes com áreas específicas pronunciadas também resultou em partículas com menores diâmetros de poro e maiores volumes específicos de poro, em função do maior recobrimento dos núcleos poliméricos. No entanto, a diminuição da vazão, assim como seu aumento pronunciado, possivelmente resulta em emulsões mais estáveis e maior aglomeração das partículas, respectivamente, provocando a diminuição do volume específico de poros e o aumento no diâmetro médio de poros. Comportamentos semelhantes foram observados para partículas à base de poliestireno. Vale ressaltar que o leve aumento observado para a área específica foi acompanhado por um leve aumento no volume específico de poros e a diminuição no diâmetro médio de poros, possivelmente em decorrência do maior tempo para o recobrimento das partículas (Reação 5;  $V=0,019$  L/h).

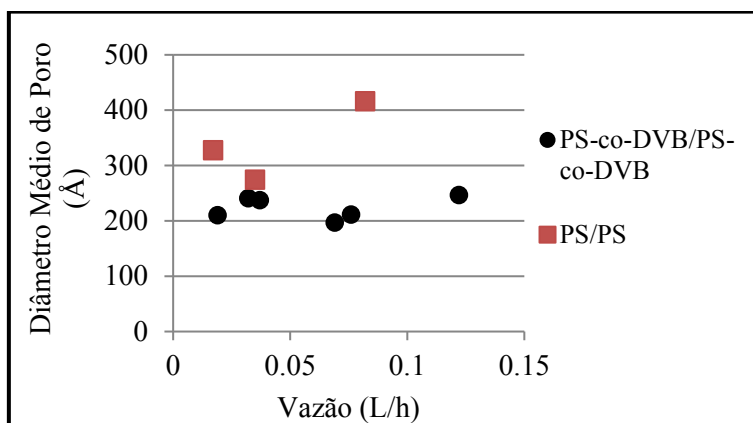
A relação existente entre cada uma das diferentes propriedades morfológicas das partículas casca-núcleo é mostrada na Figura 18. É possível notar uma linearidade entre a área específica dos suportes produzidos e o volume específico de poros. Como mostrado detalhadamente no estudo realizado por PINTO (2013), esse comportamento é observado principalmente porque o aumento da área específica das partículas está associado ao aumento de partículas depositadas sobre o núcleo polimérico e não à morfologia das partículas emulsificadas. Dessa forma, os novos resultados corroboram a análise desenvolvida por PINTO (2013). Além disso, nota-se também que a diminuição do diâmetro médio de poro é acompanhada pelo aumento de área específica das partículas, resultado também observado por PINTO (2013) e que também é resultado do aumento das partículas emulsificadas e depositadas sobre o núcleo.



(A)



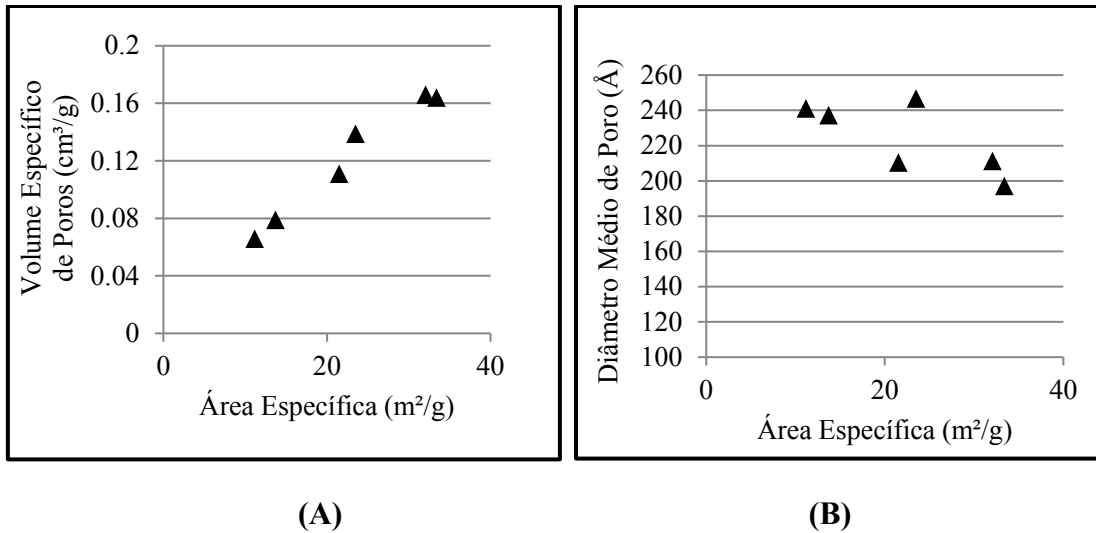
(B)



(C)

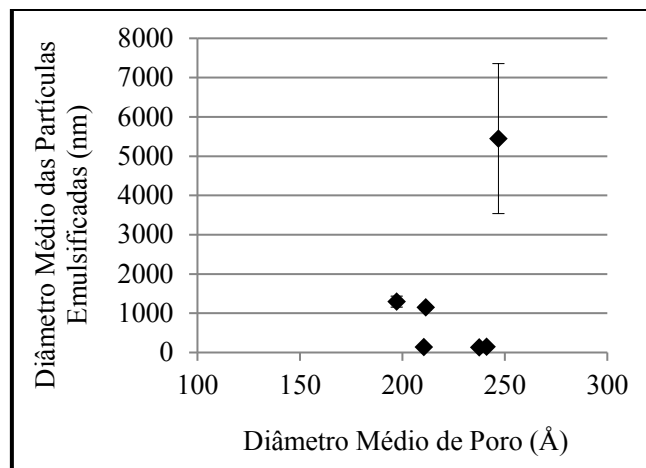
**Figura 17.** Influência da vazão de alimentação nas seguintes propriedades morfológicas das partículas casca-núcleo: **(A)** área específica; **(B)** volume específico de poros; **(C)** diâmetro médio de poro. Todos os resultados correspondentes às partículas de PS/PS foram extraídos de (PINTO, 2013).





**Figura 18.** Relação existente entre as propriedades morfológicas dos suportes: **(A)** área específica e volume específico de poros; **(B)** área específica e diâmetro médio de poro.

BESTETI (2011) observou que poderia haver uma relação entre o diâmetro médio de poros das partículas casca-núcleo e o diâmetro médio das partículas emulsificadas. No entanto, PINTO (2013) não observou a correlação entre essas propriedades para partículas de poliestireno. Assim, um estudo semelhante foi realizado para as partículas produzidas no presente estudo. Como pode ser observado na Figura 19, aparentemente não há uma correlação entre ambas as propriedades, corroborando os resultados obtidos por PINTO (2013).



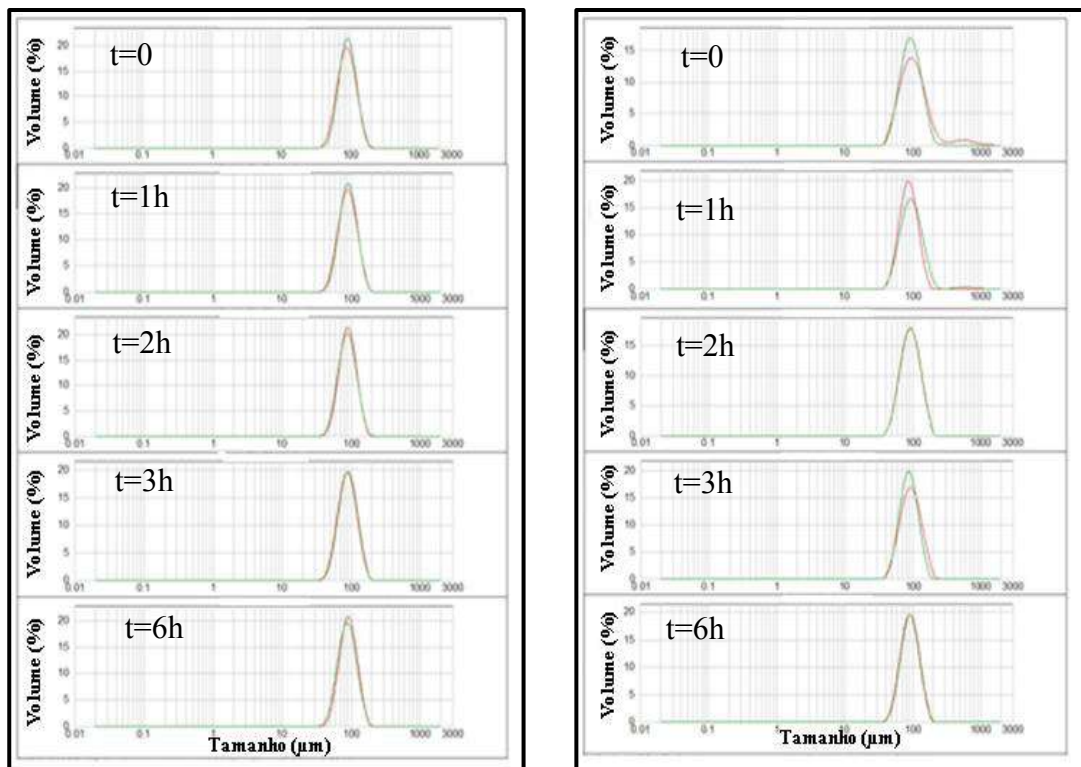
**Figura 19.** Relação existente entre o diâmetro médio de poro e o diâmetro médio das partículas emulsificadas.

### 2.3.1.6. *Resistência Mecânica das Partículas Produzidas*

O objetivo principal do presente trabalho é o desenvolvimento de biocatalisadores; assim, a avaliação da estabilidade mecânica dos suportes poliméricos é fundamental, uma vez que a vantagem principal da imobilização enzimática é justamente a possibilidade de reutilizar os biocatalisadores em diferentes ciclos. Dessa forma, como não há uma análise definida para avaliar as partículas com morfologia casca-núcleo, estabeleceu-se uma metodologia para tal fim. Para isso, os diferentes suportes poliméricos foram submetidos a diferentes tensões de cisalhamento e as distribuições de tamanhos das partículas obtidas ao longo desse período de agitação foram analisadas, assim como os diâmetros médios correspondentes. Partículas de poliestireno também foram avaliadas, buscando-se avaliar se a adição de divinilbenzeno ao sistema provocava aumento na resistência mecânica das partículas.

Inicialmente apenas os núcleos poliméricos foram avaliados (Reação 1 (P(S-co-DVB)); Reação R2 (PS; produzida por PINTO, 2013)). Os resultados obtidos são apresentados a seguir. Ao analisar as Figura 20, 21 e 22, é possível perceber que tanto as partículas de poliestireno quanto as partículas do copolímero de poli(estireno-co-divinilbenzeno) não apresentaram modificação na distribuição de tamanhos ao longo do tempo, mantendo diâmetro médio em torno de 100  $\mu\text{m}$ . Apenas para as partículas de poliestireno, quando uma velocidade de agitação de 800 rpm foi imposta ao sistema, houve um leve deslocamento das curvas de distribuição para diâmetros menores, em decorrência provavelmente da quebra de algumas partículas. Dessa forma, é possível afirmar que os núcleos são mecanicamente resistentes e que a adição de DVB reforça a resistência mecânica dos núcleos poliméricos.

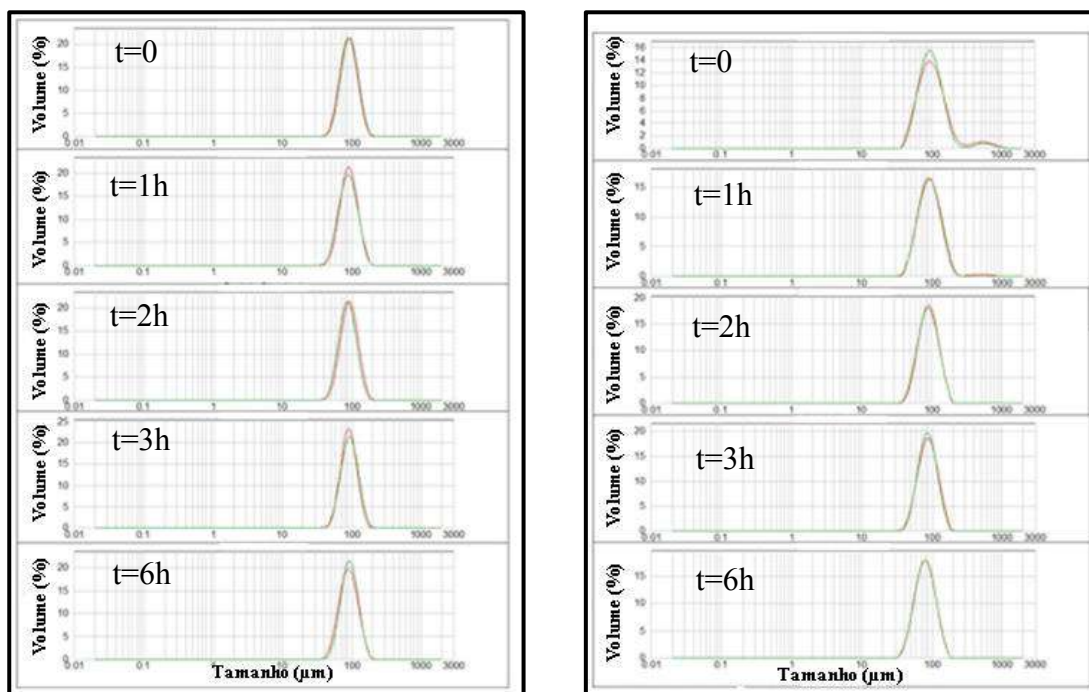
Os diâmetros médios ( $d_{50}$ ) das partículas também foram avaliados. Na Figura 23 os diferentes valores obtidos para as diferentes amostras analisadas são mostrados. Pode-se perceber que os diâmetros médios das partículas à base de PS-co-DVB são estatisticamente iguais. No entanto, ao analisar as partículas de poliestireno, nota-se um decréscimo do diâmetro médio dos suportes ao longo do período de agitação, principalmente para valores de agitação de 800 rpm. A Figura 23 evidencia a importância da adição de DVB como aditivo de reforço da resistência mecânica dos núcleos.



(A)

(B)

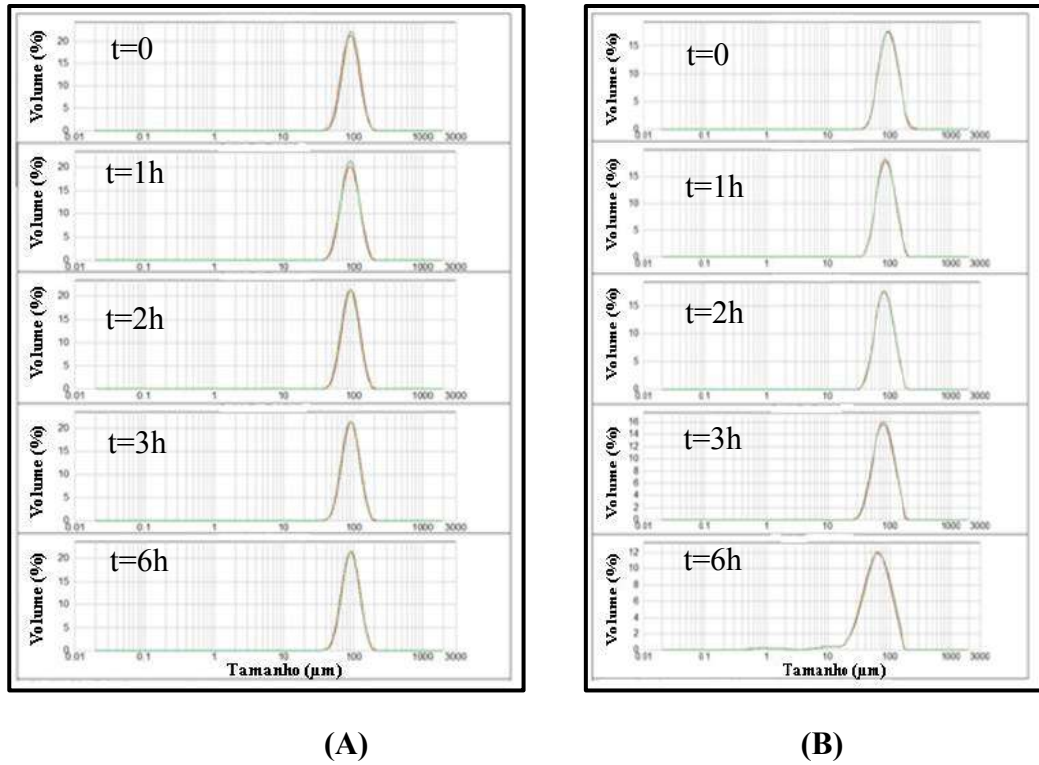
**Figura 20.** Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação de 200 rpm: (A) PS-co-DVB; (B) PS.



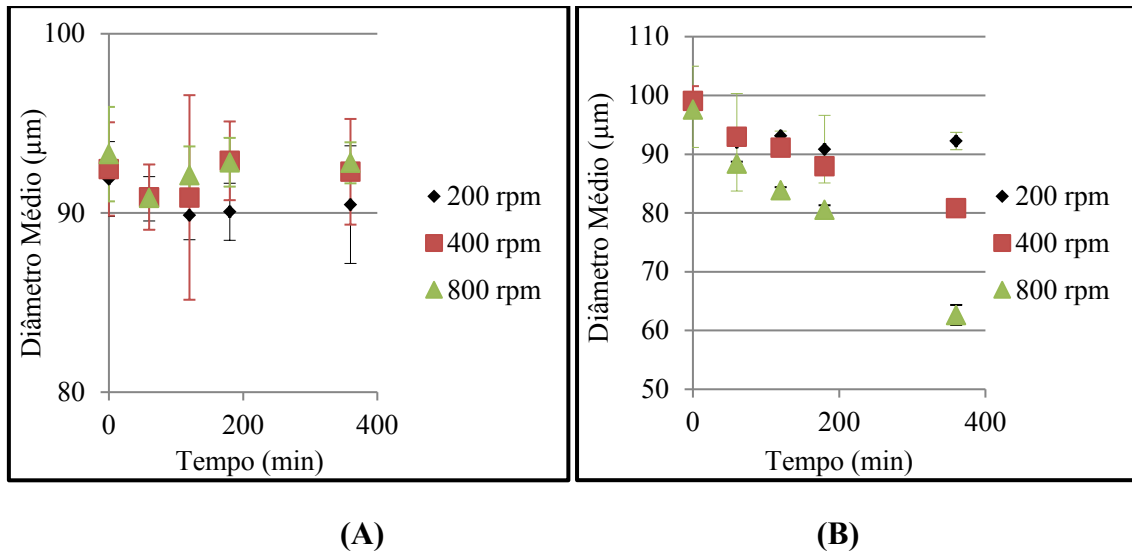
(A)

(B)

**Figura 21.** Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 400 rpm: (A) PS-co-DVB; (B) PS.



**Figura 22.** Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 800 rpm: (A) PS-co-DVB; (B) PS.

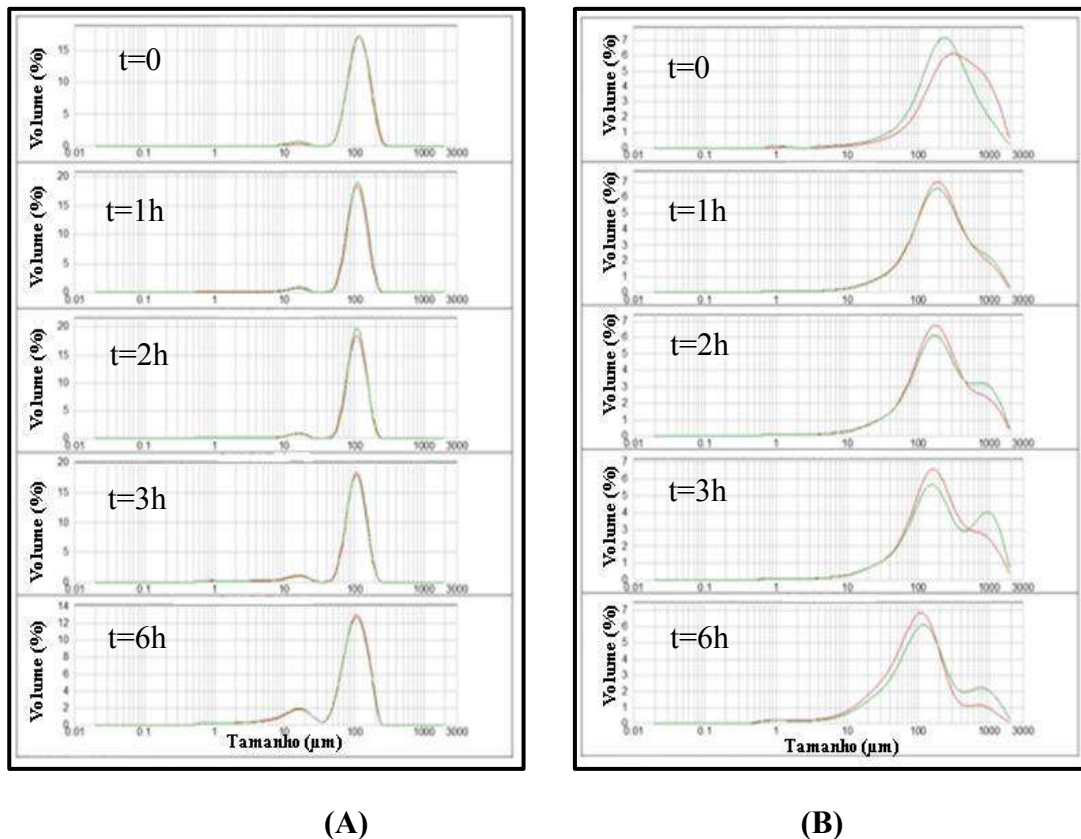


**Figura 23.** Comparação entre os diâmetros médios dos núcleos poliméricos: (A) PS-co-DVB; (B) PS.

Para avaliar as partículas com morfologia casca-núcleo, foram selecionados suportes que apresentassem áreas específicas semelhantes, de forma a garantir que o grau

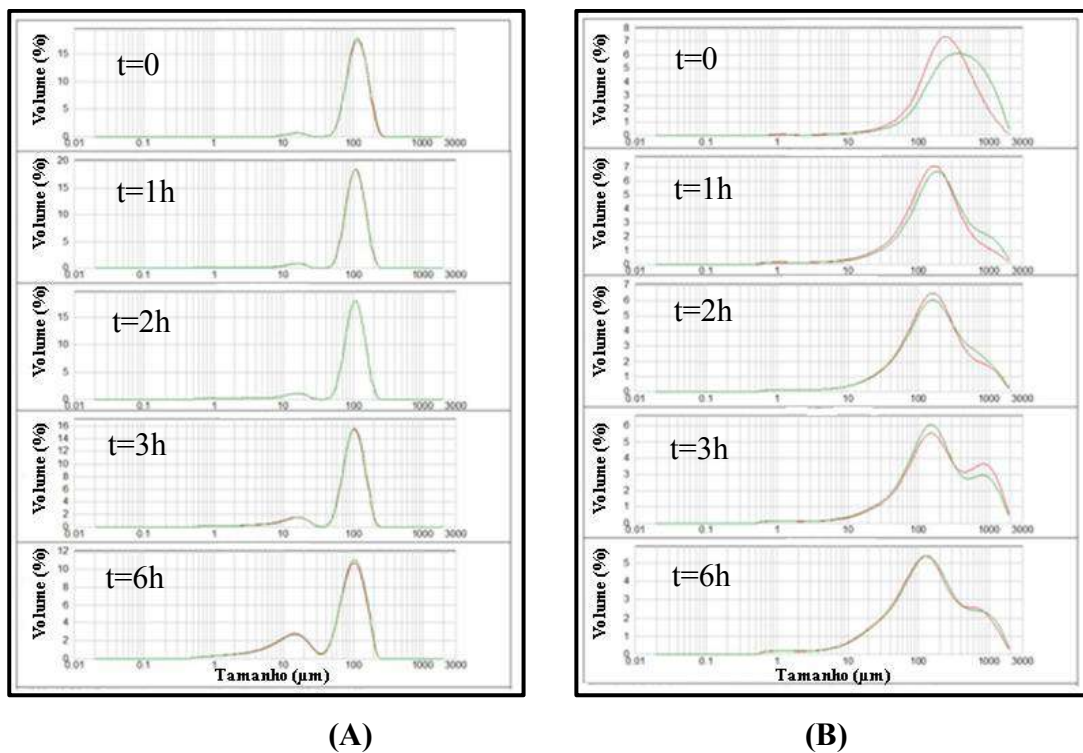
de recobrimento das partículas fosse similar. Assim, para tal análise foram selecionados o suporte P(S-co-DVB/P(S-co-DVB) (Reação 2; Aesp = 11,2 m<sup>2</sup>/g) e o suportes PS/PS produzidos por PINTO (2013) (Reação R3; Aesp=16,5 m<sup>2</sup>/g).

São apresentados, em seguida, os resultados encontrados quando as partículas com morfologia casca-núcleo foram avaliadas. Ao observar a Figura 24, em que uma menor velocidade de agitação foi imposta ao sistema, nota-se que ao longo do tempo há um aumento de partículas de menor diâmetro tanto para as partículas de poliestireno quanto para o copolímero de estireno e divinilbenzeno. No entanto, apenas analisando a figura não é possível identificar em que grupo esta diminuição é mais significativa. Vale mencionar que a heterogeneidade das partículas de PS/PS já havia sido descrita por PINTO (2013) e dificulta a realização de uma análise mais precisa. A despeito disso, é importante ressaltar que a mudança da distribuição de tamanhos de partícula não foi muito pronunciada.

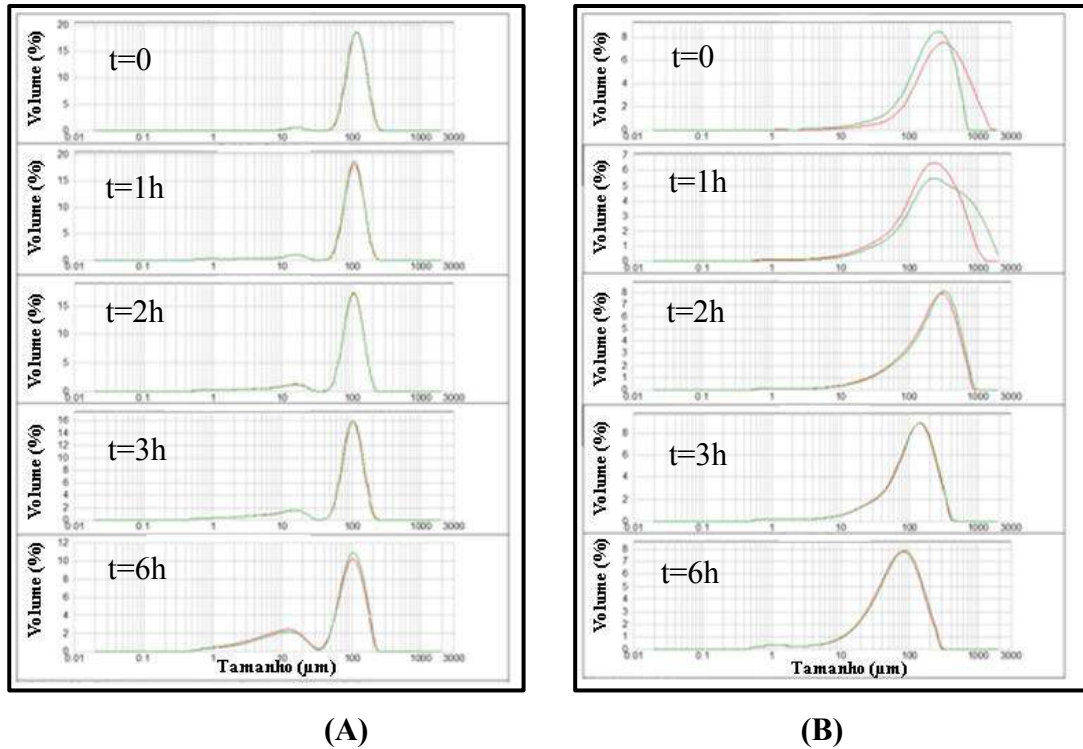


**Figura 24.** Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 200 rpm: (A) PS-co-DVB/PS-co-DVB; (B) PS/PS.

Nas Figuras 25 e 26 pode-se observar o comportamento das curvas de distribuição quando maiores velocidades de agitação são empregadas. É possível notar que para as partículas de poliestireno há um alargamento das curvas de distribuição de tamanhos e um deslocamento dessas curvas para diâmetros menores ao longo de todo o tempo de análise. No entanto, para as partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno), o diâmetro característico em torno de 100  $\mu\text{m}$  é mantido. Contudo, ao longo do período de análise, ocorre o aparecimento de uma curva correspondente a diâmetros menores, que se torna mais intensa nos instantes finais da análise. O aumento de partículas de menor diâmetro é resultado da provável quebra das partículas, quando expostas a elevadas tensões de cisalhamento. Vale ressaltar que apenas com essas análises não foi possível afirmar que a adição de divinilbenzeno provoca um aumento pronunciado da resistência mecânica das partículas casca-núcleo.

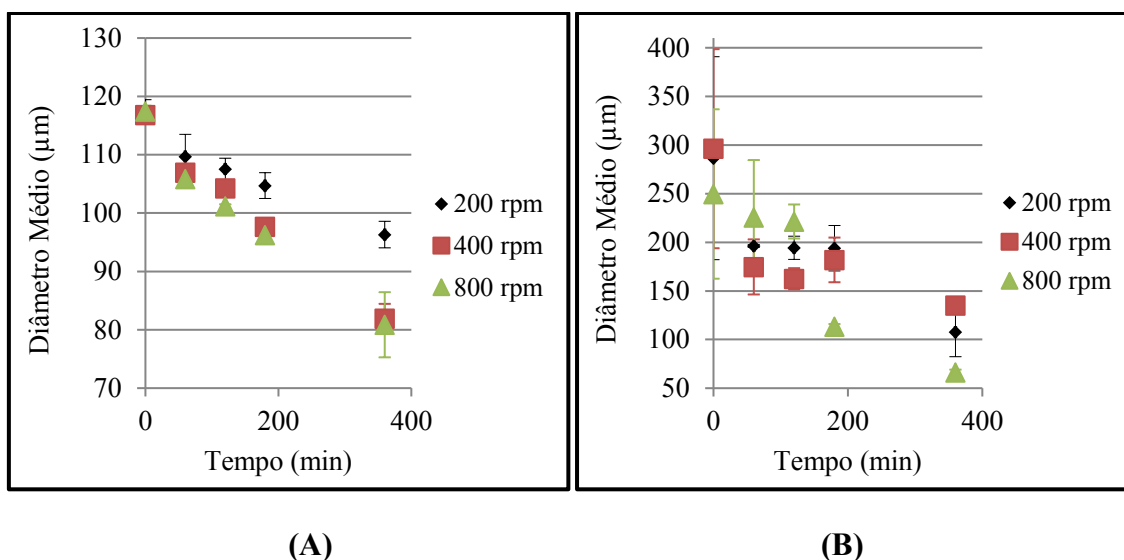


**Figura 25.** Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 400 rpm: **(A)** PS-co-DVB/PS-co-DVB; **(B)** PS/PS.



**Figura 26.** Distribuição de tamanhos de partícula empregando-se uma velocidade de agitação igual a 800 rpm: **(A)** PS-co-DVB/PS-co-DVB; **(B)** PS/PS.

Os diâmetros médios ( $d_{50}$ ) dos suportes também foram avaliados. É possível observar, na Figura 27, a queda do diâmetro médio das partículas casca-núcleo ao longo do tempo de análise. Parece ser possível afirmar que a adição de divinilbenzeno ao meio reacional provoca um aumento da resistência mecânica das partículas (PS-co-DVB: há uma diminuição do diâmetro médio de 115  $\mu\text{m}$  no início da análise para 95  $\mu\text{m}$ , após as 6 horas, a 200 rpm; PS/PS: ocorre uma diminuição do diâmetro médio das partículas de aproximadamente 300  $\mu\text{m}$  para 100  $\mu\text{m}$ , a 200 rpm). A 800 rpm, o tamanho médio das partículas de PS, apesar de maiores no início, ao final da análise torna-se menor que o diâmetro médio encontrado para as partículas à base de DVB, reforçando o papel desse comonômero no reforço na resistência mecânica das partículas casca-núcleo.



**Figura 27.** Comparação entre os diâmetros médios das partículas com morfologia casca-núcleo: **(A)** PS-co-DVB/PS-co-DVB; **(B)** PS/PS.

### 2.3.2. *Comparação das Propriedades Morfológicas das Partículas do Núcleo, das Nanopartículas da Casca e das Partículas Casca-núcleo*

Com base nos resultados encontrados no primeiro bloco de experimentos, um segundo grupo de reações foi realizado com o objetivo de comparar as propriedades morfológicas das partículas que compõem os núcleos poliméricos, das nanopartículas formadoras da casca e das partículas casca-núcleo propriamente ditas em um sistema de referência. Tais partículas foram empregadas no processo de imobilização enzimática e o desempenho de cada uma na síntese de biocatalisadores foi avaliado (os resultados serão apresentados no **Capítulo III**). Assim, empregando os novos lotes de monômeros, descritos na seção de Materiais, foram produzidas partículas apenas do núcleo (Reação 12), apenas nanopartículas (Reação 14) e partículas casca-núcleo (Reação 13), empregando-se as condições operacionais que resultaram nas partículas com áreas específicas e porosidades mais expressivas do primeiro bloco de reações (Reação 5;  $V=0,069$  L/h), apresentado na **Seção 2.3.1**. Os experimentos propostos neste segundo grupo de reações são mostrados na Tabela 8.



**Tabela 8.** Condições operacionais de cada uma das diferentes reações realizadas no segundo bloco de experimentos.

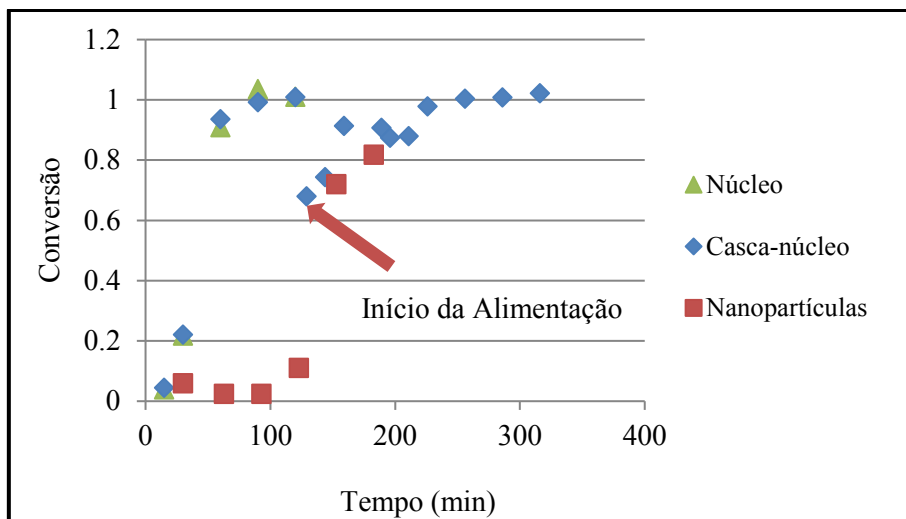
Condição Operacional		
Reação	Legenda	Vazão de Alimentação Real (L/h)
12	Núcleo	- <sup>1</sup>
13	Casca-núcleo	0,069 ± 0,006
14	Nanopartículas	0,074 ± 0,006

<sup>1</sup> Foi conduzida uma reação em suspensão para formação dos núcleos poliméricos.

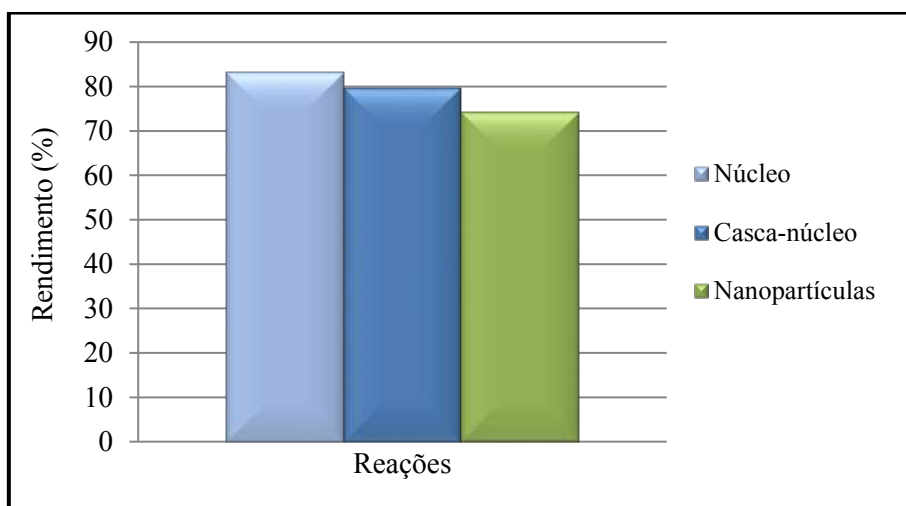
### 2.3.2.1. *Análise Cinética e Rendimento*

A análise cinética das diferentes reações realizadas é mostrada na Figura 28. É possível notar a conversão elevada dos núcleos poliméricos em tempos relativamente curtos, comprovando os resultados obtidos anteriormente. O núcleo polimérico obtido no bloco anterior apresentou conversões um pouco mais baixas, quando comparado aos resultados obtidos neste segundo bloco, possivelmente em função da presença de resquícios de inibidores ainda presentes no meio monomérico. A cinética de polimerização em emulsão foi um pouco mais lenta, quando comparada com os resultados encontrados para as demais reações de polimerização.

Na Figura 29 é possível observar o rendimento das reações realizadas. Nota-se que os diferentes experimentos apresentaram rendimentos semelhantes e elevados, acima de 70 %. O menor valor encontrado (74 %) correspondeu à reação em emulsão. É importante mencionar que o produto dessa reação 14 foi submetido ao processo de liofilização para secagem das partículas. Mas, ainda assim, provavelmente, em função do tamanho reduzido das partículas, houve um aumento na perda de material, resultando em uma queda no rendimento da reação.



**Figura 28.** Análise cinética das reações realizadas no segundo bloco de experimentos.

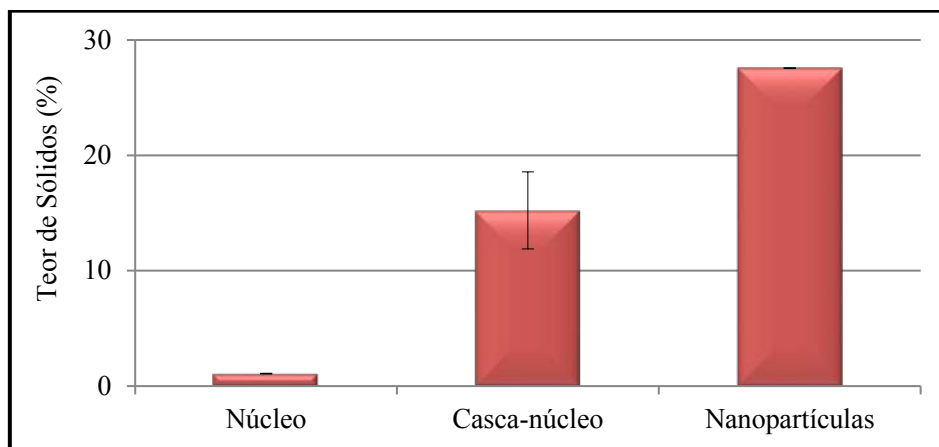


**Figura 29.** Rendimento das reações executadas no segundo bloco de experimentos.

### 2.3.2.2. Análises do Látex

O teor de sólidos relativo a cada uma das reações é mostrado na Figura 30. O menor teor de sólidos foi encontrado quando apenas uma reação em suspensão foi conduzida, resultado já esperado. A reação correspondente à síntese das nanopartículas apresentou elevado teor de sólidos, resultado também já esperado, uma vez que não houve nenhum processo de captura de tais partículas. A reação em que ambos os processos foram conduzidos simultaneamente resultou em um valor de teor de sólidos intermediário, uma vez que parte das partículas geradas no processo em emulsão foi

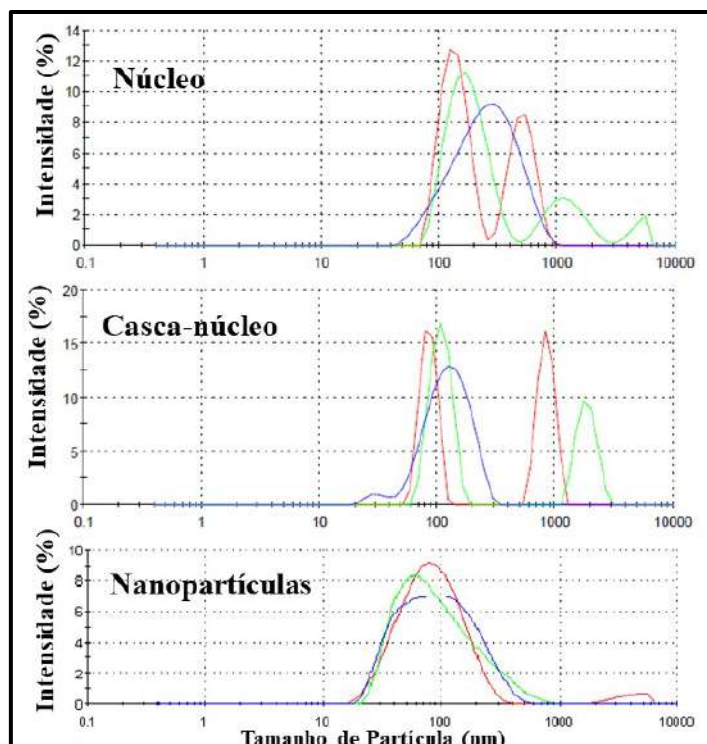
capturada pelo núcleo adesivo, havendo redução do material polimérico no sobrenadante ao final da reação.



**Figura 30.** Teor de sólidos presentes no látex ao final das reações do segundo bloco de experimentos.

É importante mencionar que uma vez mais as partículas do sobrenadante não foram solubilizadas no solvente utilizado, THF. Apesar da mudança nos fornecedores dos monômeros empregados, todas as características das partículas do látex foram mantidas.

A distribuição de tamanhos das partículas presentes no sobrenadante ao final de cada reação é mostrada na Figura 31, enquanto o diâmetro médio é apresentado na Tabela 9. A partir da análise dos resultados obtidos, nota-se que a reação correspondente à síntese do núcleo resultou em partículas emulsificadas com diâmetros maiores, ao comparar com as partículas encontradas no bloco anterior, em função provavelmente de alguma alteração no meio racional provocada pela mudança de pureza dos reagentes. A reação em emulsão, conduzida para geração apenas das nanopartículas formadoras da casca polimérica, resultou em partículas com os menores diâmetros e com distribuição de tamanhos monomodal. O diâmetro médio obtido para as partículas deste sistema (73 nm) é condizente com valores característicos reportados na literatura (50 - 300 nm) para processos em emulsão clássica (QIU *et al.*, 2001).



**Figura 31.** Distribuição de tamanhos das partículas presentes no látex ao final de cada reação do segundo bloco de experimentos.

**Tabela 9.** Diâmetro médio das partículas do sobrenadante das reações conduzidas no segundo bloco de experimentos.

Reação	Legenda	Diâmetro Médio (nm)
12	Núcleo	$199,0 \pm 13,1$
13	Casca-núcleo	$349,4 \pm 63,9$
14	Nanopartículas	$73,4 \pm 0,4$

### 2.3.2.3. Distribuição das Massas Molares das Partículas Casca-núcleo

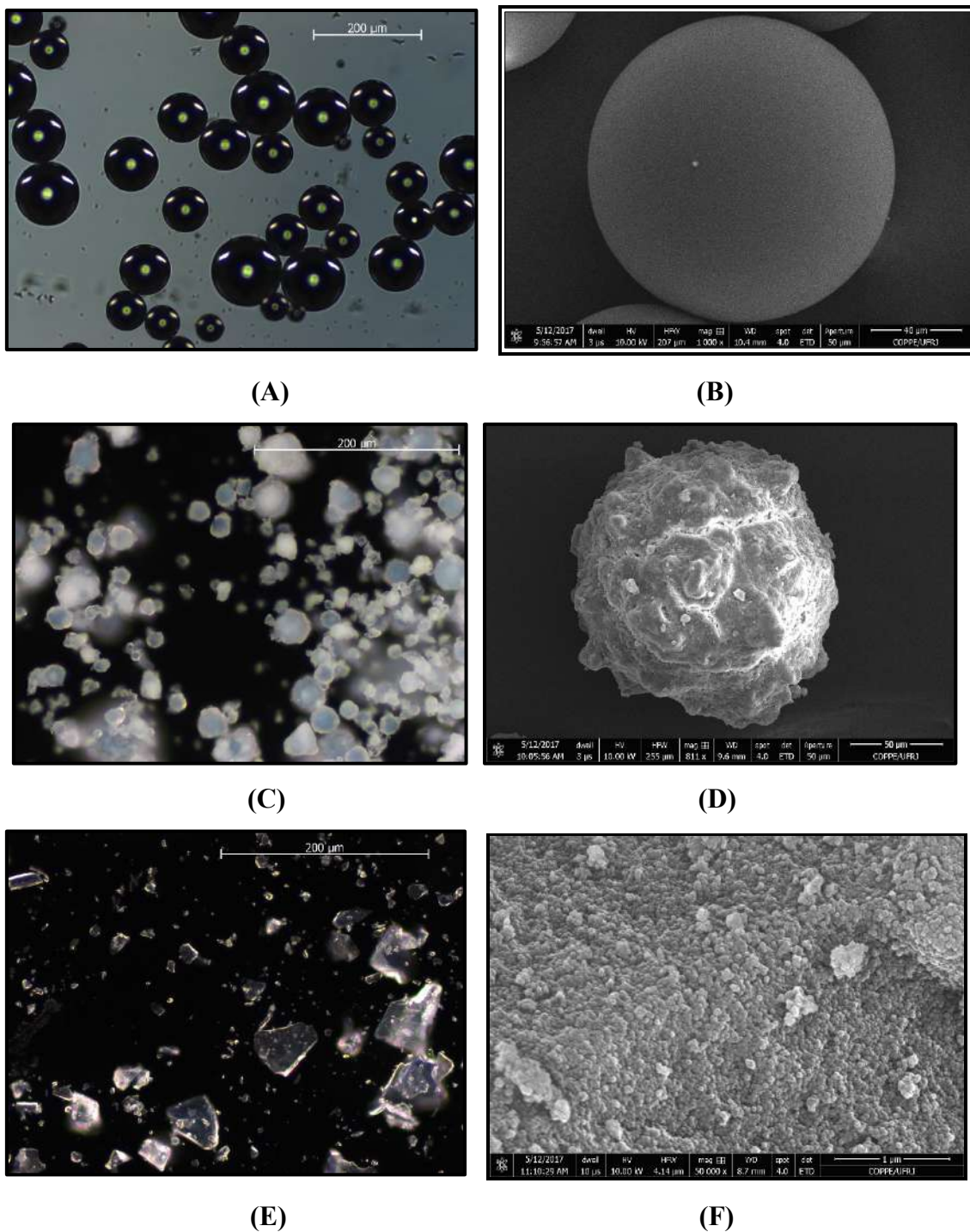
Análises para determinação da distribuição das massas molares das cadeias poliméricas também foram realizadas. Contudo, nenhuma das amostras produzidas foi solúvel em THF, corroborando os resultados já obtidos e reforçando a ação reticulante do componente divinilbenzeno, já mencionada anteriormente.

#### 2.3.2.4. *Morfologia das Partículas Produzidas*

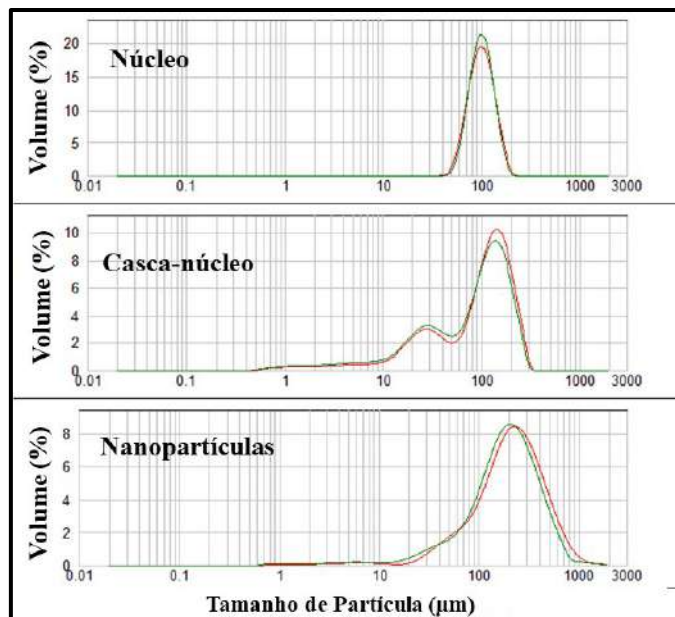
A morfologia das diferentes partículas produzidas neste segundo bloco de experimentos pode ser observada na Figura 32. É possível notar novamente a estrutura esférica dos núcleos poliméricos nas Figuras 32 A e 32 B. Nas Figuras 32 C e 32 D, observam-se as partículas com morfologia casca-núcleo, apresentando uma morfologia também esférica e um caráter mais opaco, em função do recobrimento da superfície pelas partículas emulsificadas. Ao analisar a Figura 32 E, correspondente às nanopartículas produzidas, nota-se a presença de lascas de material, provavelmente resíduos de filmes poliméricos resultantes de possíveis aglomerações das nanopartículas durante o processo de reação ou secagem. As nanopartículas sintetizadas podem ser observadas na Figura 32 F. Em função da resolução do microscópio utilizado, as nanopartículas produzidas não puderam ser observadas com mais detalhe.

Na Figura 33 são mostradas as distribuições de tamanhos das partículas produzidas. A reação conduzida em suspensão e emulsão simultâneas resultou na síntese de partículas com distribuição de tamanhos mais larga e um aumento de partículas de menor diâmetro, quando comparada às partículas do núcleo, em decorrência da simultânea condução do processo em emulsão. Contudo, observou-se também uma larga distribuição de tamanhos para partículas obtidas por meio da reação conduzida apenas em emulsão. Os elevados diâmetros encontrados para este sistema são resultado da formação de aglomerados poliméricos durante o processo de secagem deste material, não tendo relevância prática para o presente estudo. As partículas produzidas em escala nanométrica não foram identificadas em decorrência dos limites de detecção do equipamento.

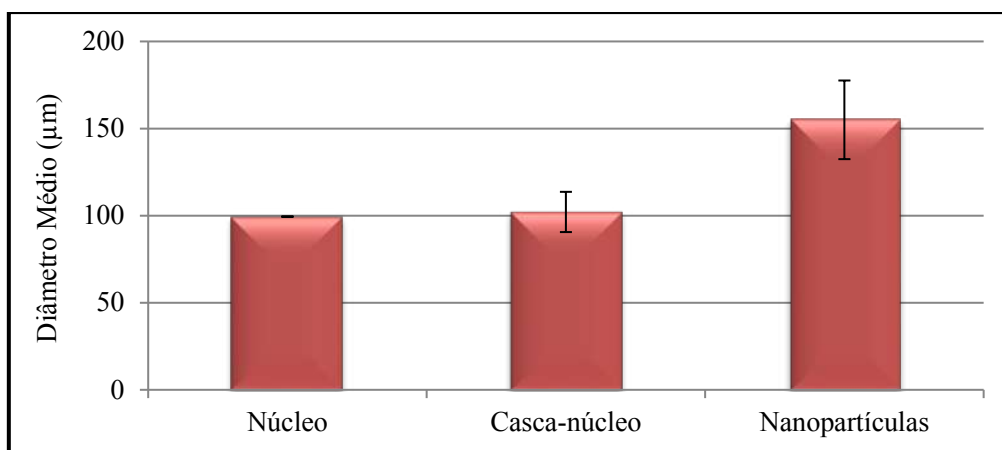
O diâmetro médio ( $d_{50}$ ) de cada uma das partículas sintetizadas é mostrado na Figura 34. Nota-se novamente que o maior diâmetro médio encontrado corresponde à reação conduzida apenas em emulsão, em função da presença dos aglomerados sólidos já descritos.



**Figura 32.** Micrografias ópticas e eletrônicas, respectivamente, das partículas produzidas no segundo bloco de experimentos: (A) e (B) núcleos de PS-co-DVB; (C) e (D) casca-núcleo de PS-co-DVB/ PS-co-DVB; (E) e (F) nanopartículas de PS-co-DVB.



**Figura 33.** Distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo produzidas no segundo bloco de experimentos.



**Figura 34.** Diâmetro médio das partículas produzidas no segundo bloco de experimentos.

Na Tabela 10 são mostradas as propriedades morfológicas das partículas sintetizadas.

**Tabela 10.** Propriedades morfológicas das partículas obtidas no segundo bloco de experimentos.

Reação	Legenda	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)	Volume Específico de Poros (cm <sup>3</sup> /g)	Diâmetro Médio de Poro (Å)
12	Núcleo	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
13	Casca-núcleo	43,43	0,231	212,88
14	Nanopartículas	112,95	0,377	128,04

<sup>1</sup> Valores não foram ser detectados pelo equipamento.

Ao observar os resultados obtidos, percebe-se que a área específica e a porosidade dos núcleos poliméricos não puderam ser determinadas, em função do baixo valor apresentado, inferior ao limite mínimo de detecção do equipamento. As partículas casca-núcleo produzidas neste grupo de reações apresentaram área específica e porosidade superiores às encontradas para as partículas do primeiro bloco de experimentos, usadas como referência (Reação 5; V=0,069 L/h), provavelmente em função da maior pureza dos monômeros utilizados. As nanopartículas apresentaram área específica expressiva, o que já era esperado em função do diâmetro de partícula reduzido desses materiais. A porosidade e diâmetro de poro detectados para esses materiais submicrométricos estão certamente associados a possíveis efeitos de condensação capilar nos interstícios das nanopartículas produzidas em emulsão.

Dessa forma, a partir de processos diferentes de polimerização, foi possível sintetizar partículas com morfologias distintas. O desempenho de cada partícula na síntese de biocatalisadores foi avaliado e os resultados serão apresentados no *Capítulo III*.

### ***2.3.3. Diferentes Estratégias para Aumento da Área Específica e Porosidade das Partículas Casca-núcleo***

A partir dos resultados obtidos nos grupos de experimentos anteriores e objetivando sintetizar partículas com área específica e porosidade mais pronunciadas, um terceiro bloco de experimentos foi proposto, alterando algumas variáveis operacionais das reações anteriores. A vazão definida como ótima no primeiro bloco de reações (*Seção 2.3.1*) foi mantida nos experimentos apresentados nesta seção. A Reação 15 foi conduzida



de forma a avaliar a reprodutibilidade dos resultados obtidos na Reação 11. Vale salientar que nas Reações 15 e 16 foram utilizados novos lotes de reagentes. Na Tabela 11 são apresentados os experimentos propostos e as vazões de alimentação correspondentes, uma vez que esta variável deve ser ajustada ao longo dos experimentos.

**Tabela 11.** Reações realizadas no terceiro bloco de experimentos.

Condição Operacional		
Reação	Legenda	Vazão de Alimentação Real (L/h)
8	Menor Conversão (1 h)	0,071 ± 0,006
9	Menor Teor de DVB (5%)	0,066 ± 0,006
10	Alimentação de Miniemulsão	0,064 ± 0,006
11	Menor Conversão (0,67 h)	0,063 ± 0,006
15	Menor Conversão (0,67 h) - Duplicata	0,068 ± 0,006
16	Menor Conversão (0,67 h) e Maior Teor de DVB	0,066 ± 0,006

Com base na análise cinética mostrada anteriormente, percebeu-se que na etapa de alimentação da emulsão a conversão dos núcleos poliméricos de PS-co-DVB apresentava valores elevados, em torno de 90 %. Dessa forma, questionou-se se o processo de captura das partículas emulsificadas estaria sendo realizado de forma eficiente, uma vez que o núcleo já apresentaria um caráter bastante rígido. Duas reações foram então propostas: as Reações 8 e 11, em que a emulsão foi alimentada em instantes mais curtos da polimerização em suspensão.

Outra questão que surgiu ao longo do trabalho está relacionada à necessidade de empregar concentrações elevadas de divinilbenzeno (reagente de elevado custo) para obtenção de partículas com áreas específicas pronunciadas, como proposto por BESTETI (2011). Assim, outro experimento foi conduzido, utilizando menor concentração de DVB, de apenas 5% m/m em relação à massa monomérica total. Foi realizada também uma reação buscando-se combinar duas variáveis que poderiam aumentar a área específica das partículas. Para isso, aumentou-se o teor de DVB no meio (40 % m/m de DVB em relação à massa monomérica total) e reduziu-se o tempo da polimerização em suspensão (0,67 h).

Por fim, a partir da análise de diferentes estudos descritos na literatura, percebeu-se que em nenhum trabalho anterior uma miniemulsão havia sido adicionada ao sistema.

Dessa forma, uma reação foi realizada, alimentando-se uma miniemulsão (composta por todos os componentes da emulsão processados em um homogeneizador de alta pressão) ao sistema de polimerização durante a etapa de emulsão alimentada.

É importante ressaltar que a reação utilizada como referência foi a Reação 5 ( $V=0,069$  L/h), que resultou nos suportes com maiores área específica e porosidade no primeiro bloco de experimentos.

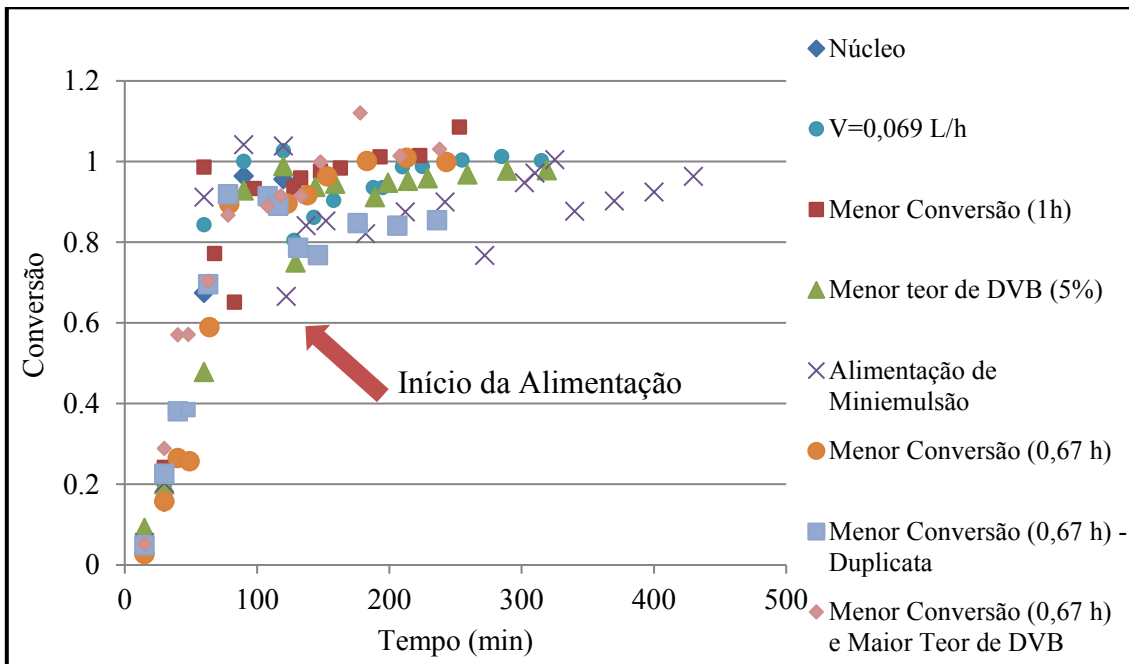
### **2.3.3.1. Análise Cinética e Rendimento**

A velocidade de polimerização de cada uma das reações foi determinada e pode ser observada na Figura 35. Os resultados cinéticos obtidos para a reação correspondente à síntese do núcleo e para a reação na qual a vazão de alimentação igual a  $0,069$  L/h foi empregada, utilizada como reação de referência, foram também apresentados para facilitar a comparação com as demais reações propostas.

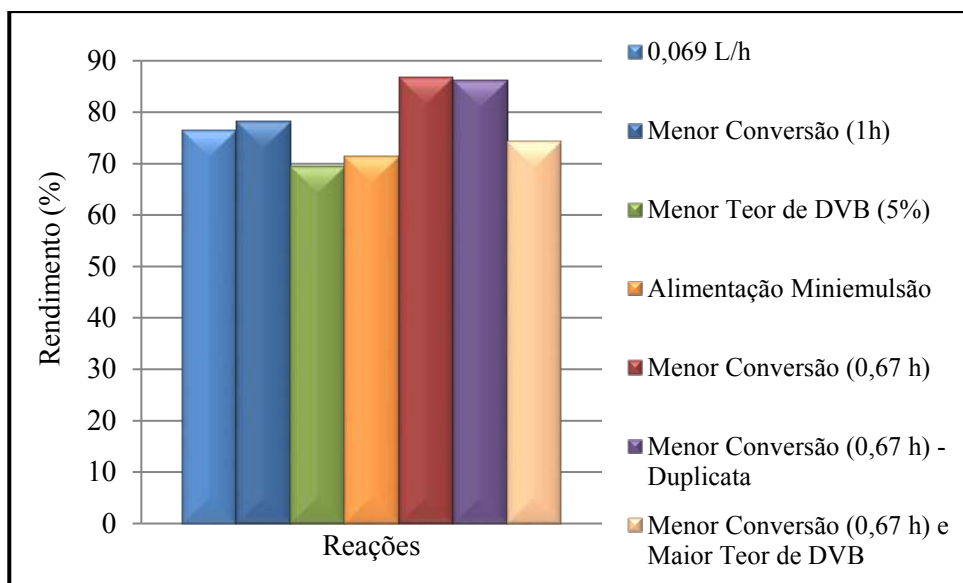
Inicialmente, é possível notar que, apesar da alimentação dos componentes da emulsão na Reação 8 ter sido iniciada em instantes mais curtos, o último ponto de amostragem da suspensão (60 min) apresentava uma conversão próxima a 100 %. Assim, a menor conversão almejada não foi alcançada. Já na Reação 11, o início da alimentação foi iniciado quando o núcleo apresentava uma conversão de apenas 25% (tempo de reação igual a 40 min), o que poderia provocar uma maior cobertura das partículas emulsificadas ao redor dos mesmos. A reação em que a miniemulsão foi alimentada não pareceu apresentar alterações no comportamento cinético. A adição de menor teor de divinilbenzeno ao meio reacional também não provocou alteração significativa na velocidade de polimerização. É possível notar também que a adição de maior teor de DVB provocou um pequeno aumento nos valores das conversões obtidas. Vale ressaltar que esta análise é muito sensível a problemas de amostragem, o que justifica a presença de alguns *outliers* em algumas cinéticas de reação.

O rendimento correspondente a cada uma das reações realizadas é mostrado na Figura 36. É possível observar que, apesar das diferentes modificações realizadas no sistema de polimerização, os rendimentos obtidos para cada uma das reações foram semelhantes. Apenas as reações em que a alimentação da emulsão foi iniciada em instantes de mais baixa conversão do núcleo (0,67 h) apresentaram rendimentos mais pronunciados, provavelmente em função de uma captura mais efetiva das partículas

emulsificadas (ao comparar os rendimentos correspondentes a cada uma das duplicatas, percebe-se a boa reprodutibilidade dos resultados). Aparentemente, o maior teor de DVB no meio reacional resultou em emulsões mais estáveis, inibindo o recobrimento dos núcleos, ou em partículas menores, havendo maiores perdas no processo de lavagem e secagem, resultando em uma redução no rendimento da reação.



**Figura 35.** Análise cinética das diferentes reações realizadas no terceiro bloco de experimentos.

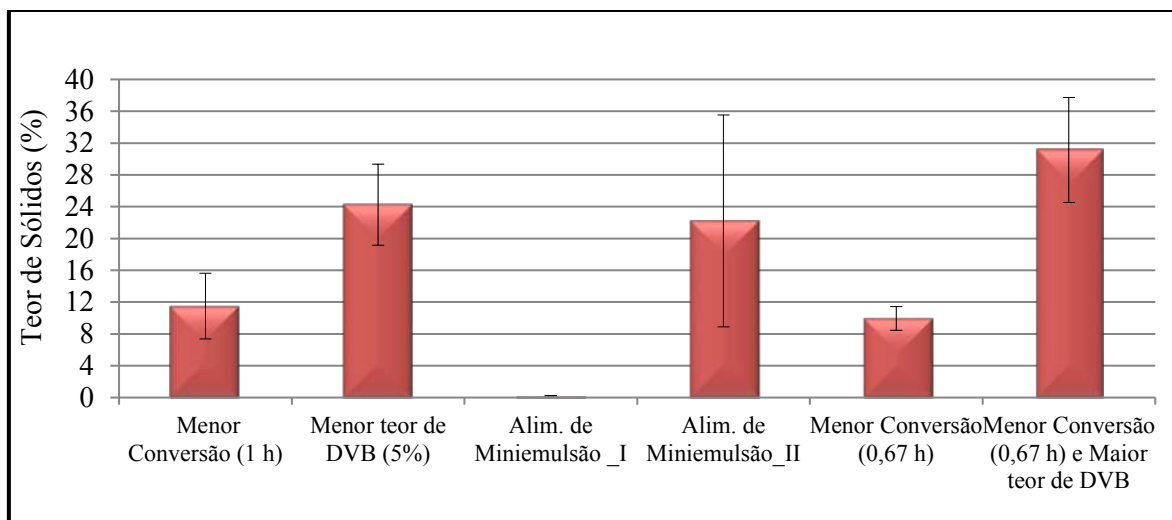


**Figura 36.** Rendimento das diferentes reações realizadas.

### 2.3.3.2. Análises do Látex

O látex presente ao final de cada reação também foi recolhido, para avaliar as características das partículas emulsificadas. O sobrenadante referente à Reação 11 não pôde ser analisado em função de problemas operacionais. Os teores de sólidos de cada um dos sobrenadantes são mostrados na Figura 37. É possível perceber que duas fases foram formadas quando uma miniemulsão foi alimentada: uma fase I, contendo baixíssimo teor de sólidos; e uma fase II, apresentado maior teor de sólidos e erro experimental expressivo, provavelmente em decorrência da heterogeneidade significativa da amostra. A Reação 8 (Menor Conversão (1 h)) apresentou teor de sólidos próximo ao valor encontrado para a amostra de referência ( $V=0,069$  L/h). Além disso, aparentemente a diminuição no teor de DVB provocou o aumento no teor partículas emulsificadas ao final da reação.

A reação em que a alimentação da emulsão ocorreu após 40 min do início da suspensão (Reação 11) resultou em baixo teor de sólidos, possivelmente em decorrência de maior recobrimento dos núcleos. Contudo, sob as mesmas condições de reação, mas aumentando-se o teor de DVB (Reação 16), percebeu-se o aumento no teor de sólidos no sobrenadante. É provável que a maior adição de DVB ao meio reacional provoque a formação de maior quantidade de partículas mais estáveis e menores, em função da mais alta velocidade de reação e de mecanismos de reticulação mais pronunciados, que permanecem dispersas no látex ao final da reação.

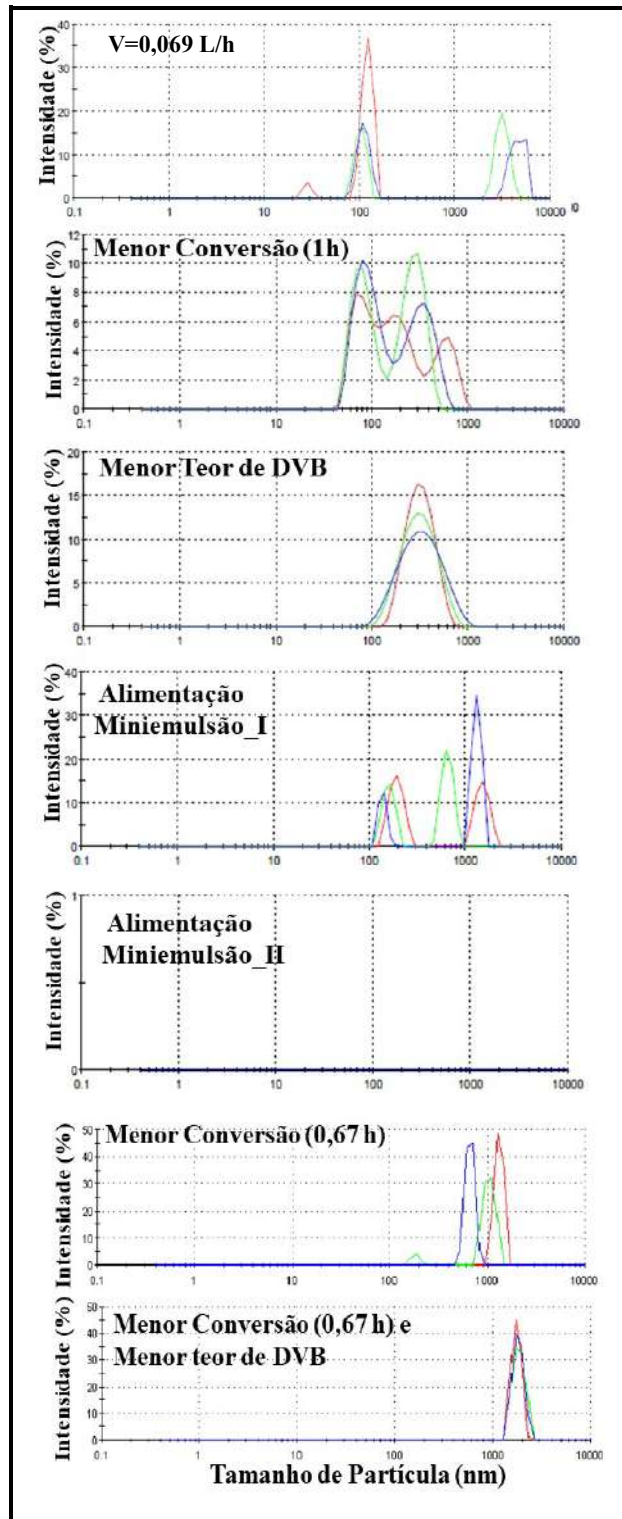


**Figura 37.** Teor de sólidos dos sobrenadantes de cada uma das reações realizadas.

Vale ressaltar que os sobrenadantes também foram avaliados quanto à distribuição de massas molares das partículas do látex. Contudo, corroborando os resultados já obtidos anteriormente, nenhuma amostra foi solubilizada no solvente padrão, THF. Como já explicado, isso se deve à reticulação promovida pelo DVB.

A distribuição de tamanhos das partículas emulsificadas presentes no sobrenadante ao final de cada reação também foi determinada e é apresentada na Figura 38. Pode-se perceber que a maior parte das estratégias adotadas resultou em aumento do diâmetro das partículas do sobrenadante, em função de maior aglomeração das partículas. O menor teor de DVB no meio reacional resultou em uma distribuição de tamanhos de partícula próxima do perfil obtido por PINTO (2013), em que apenas partículas de PS foram produzidas. Já a reação em que uma miniemulsão foi alimentada, a fase I (correspondente à fase na qual praticamente não foi detectado teor de sólidos) apresentou poucas partículas de maior diâmetro dispersas, enquanto a fase II apresentou partículas com diâmetros tão pronunciados que não puderam ser detectados pelo equipamento utilizado. Nota-se também que a alimentação da emulsão com menor tempo de reação em suspensão (0,67 h) gerou partículas emulsificadas com diâmetros pronunciados. Além disso, a maior adição de divinilbenzeno no meio reacional combinada a menor duração da suspensão também provocou um aumento expressivo de partículas de maior diâmetro. Apenas a reação em que houve redução na duração da etapa em suspensão (1 h) resultou em distribuições de tamanhos de partícula deslocadas para diâmetros maiores e também menores (quando comparada à Reação de Referência,  $V=0,069$  L/h), possivelmente em decorrência de uma menor aglomeração das partículas emulsificadas.

Os resultados encontrados na Figura 38 são reforçados quando se analisam os diâmetros médios das partículas do sobrenadante, mostrados na Tabela 12. O valor do diâmetro médio detectado para a fase II, quando uma miniemulsão foi alimentada, comprova que as partículas obtidas encontram-se em uma faixa de diâmetros acima do valor máximo detectado pelo equipamento. O diâmetro médio determinado pela análise foi de 24  $\mu\text{m}$ , enquanto o limite máximo do equipamento é de apenas 10  $\mu\text{m}$ , confirmando a total imprecisão no valor obtido.



**Figura 38.** Distribuição de tamanhos das partículas presentes no látex ao final de cada reação.

**Tabela 12.** Diâmetro médio das partículas dos sobrenadantes do terceiro bloco de reações.

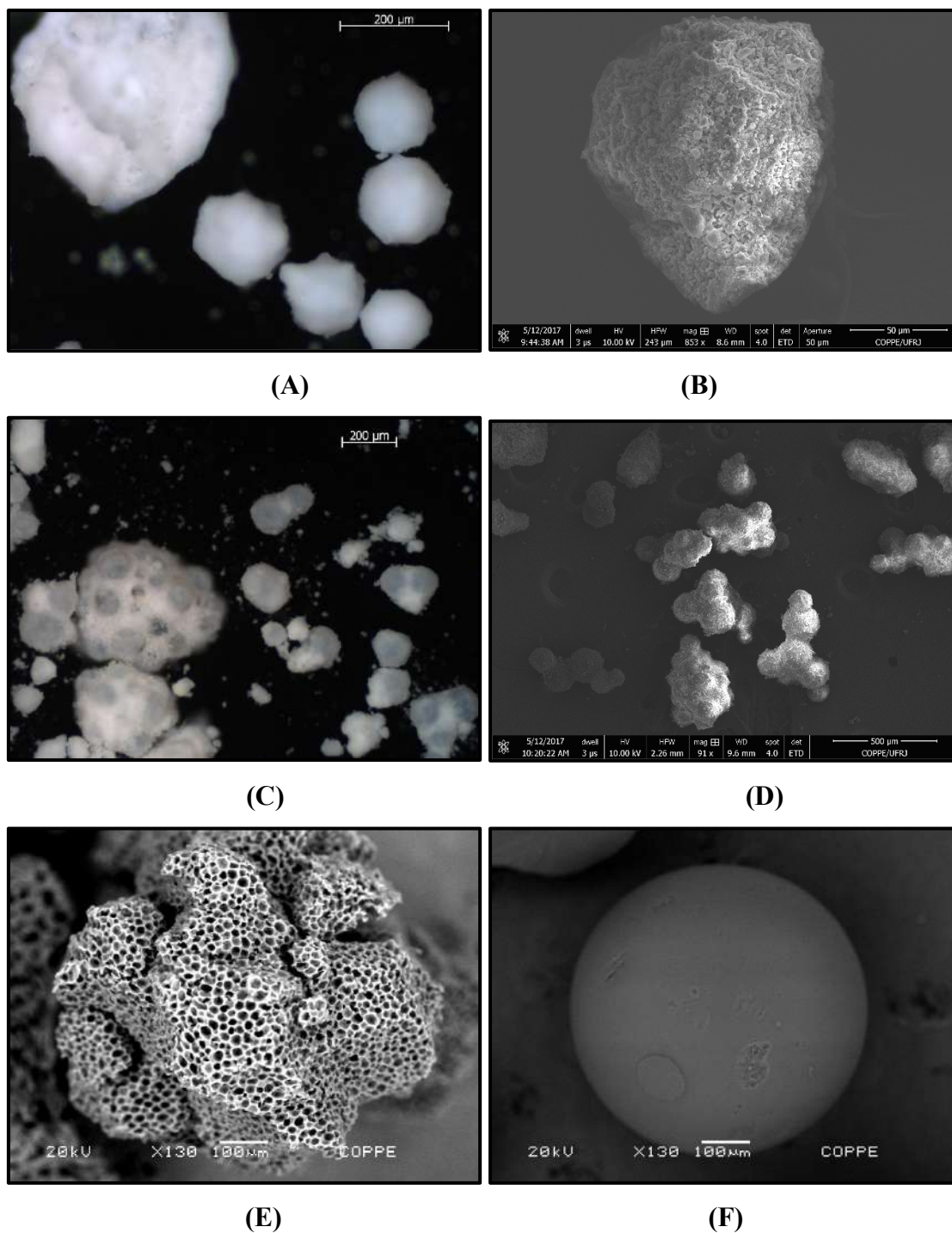
Reação	Legenda	Diâmetro Médio (nm)
8	Menor Conversão (1 h)	343,2 ± 78,8
9	Menor Teor de DVB (5%)	263,3 ± 8,2
10_I	Alimentação de Miniemulsão I	2114,7 ± 995,4
10_II	Alimentação de Miniemulsão II	24600 ± 21357,9
15	Menor Conversão (0,67 h)	3803,7 ± 842,0
16	Menor Conversão (0,67 h) e Maior Teor de DVB	3581,0 ± 1938,1

### 2.3.3.3. *Distribuição das Massas Molares das Partículas Casca-núcleo*

As partículas casca-núcleo também foram avaliadas quanto à distribuição das massas molares das cadeias poliméricas. Contudo, nenhuma amostra foi solubilizada em THF, corroborando os resultados já obtidos para as partículas do sobrenadante e os encontrados anteriormente no primeiro e segundo blocos de experimentos. Novamente, as cadeias poliméricas encontram-se reticuladas, incluindo as que foram obtidas a partir da reação em que apenas 5 % de divinilbenzeno foi adicionado.

### 2.3.3.4. *Morfologia das Partículas Casca-núcleo*

A morfologia das partículas produzidas a partir da Reação 11 (Menor Conversão (0,67 h)) e Reação 16 (Menor Conversão (0,67 h) e Maior Teor de DVB) são mostradas na Figura 39. É possível notar nas Figura 39 A e 39 B novamente a morfologia esférica das partículas casca-núcleo e o caráter opaco da superfície, em decorrência do recobrimento pelas partículas geradas na emulsão. Nas Figuras 39 C e 39 D são mostrados alguns aglomerados formados em algumas das reações de polimerização. A morfologia do suporte comercial Accurel (suporte à base de polipropileno) é mostrada na Figura 39 E para fins comparativos, uma vez que este suporte é largamente empregado no processo de imobilização enzimática. A enzima imobilizada comercial, *Novozym 435*, também é apresentada para fins ilustrativos, na Figura 39 F.



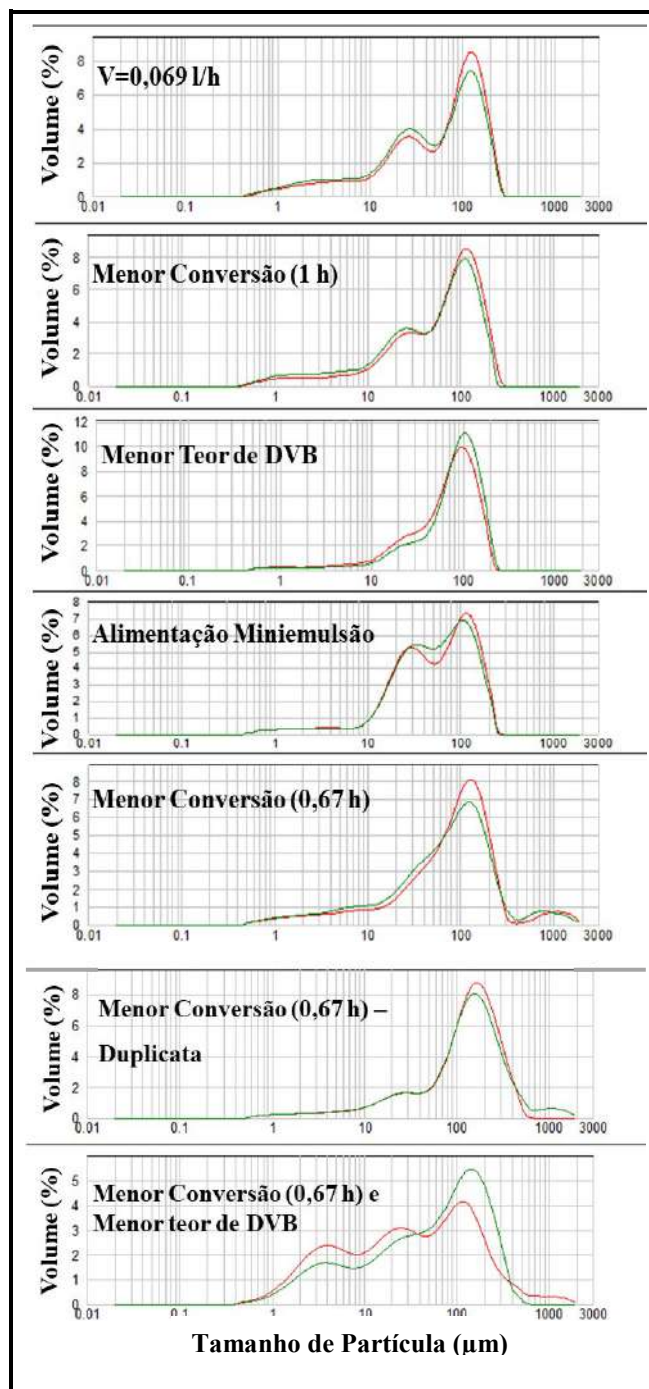
**Figura 39.** Micrografias das partículas casca-núcleo produzidas no terceiro bloco de experimentos e dos materiais comerciais: **(A)** MO das partículas da Reação 11 (Menor Conversão (0,67 h)); **(B)** MEV das partículas da Reação 11 (Menor Conversão (0,67 h)); **(C)** MO das partículas da Reação 16; **(D)** MEV das partículas da Reação 16; **(E)** MEV do suporte comercial Accurel; **(F)** MEV do biocatalisador comercial *Novozym 435*.



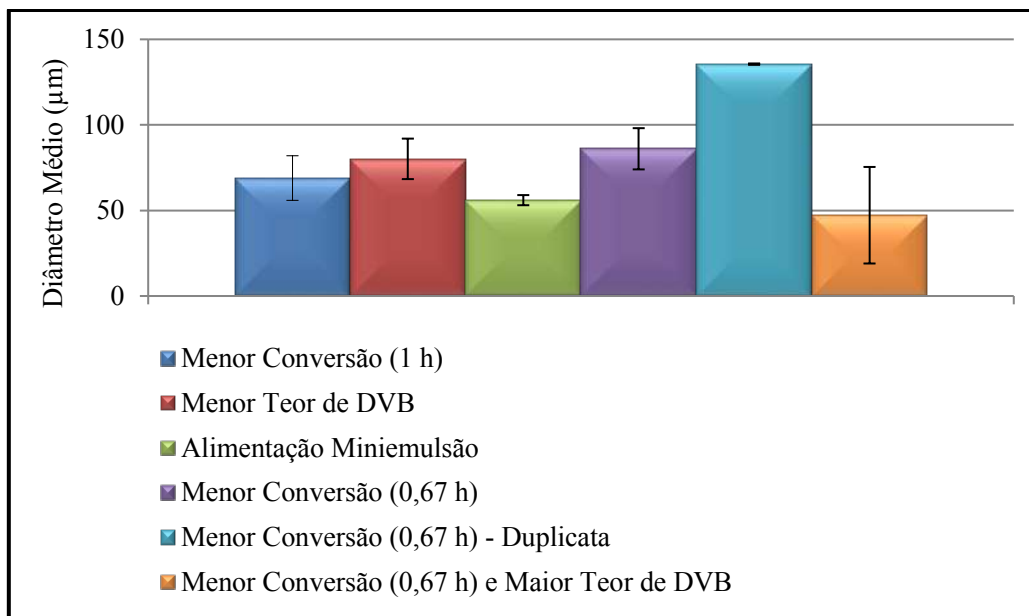
A distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo do terceiro bloco de experimentos também foi determinada e é mostrada na Figura 40. É possível observar que a reação em que etapa da suspensão foi conduzida por 1 h resultou em partículas com a mesma distribuição de tamanhos da reação de referência ( $V=0,069$  L/h). No entanto, nota-se para as reações em que a suspensão foi conduzida por um período ainda mais reduzido (0,67 h), que a distribuição de tamanhos de partícula tornou-se mais larga, com menor quantidade de partículas de menor diâmetro. Provavelmente sob essas condições ocorreu um recobrimento mais eficiente do núcleo (mais adesivo), diminuindo o grau de aglomeração das próprias partículas emulsificadas. A maior adição de divinilbenzeno ao meio provocou maior alargamento das curvas de distribuição e aumento pronunciado da quantidade de partículas de menor diâmetro, decorrentes ou de uma maior produção de partículas com menor diâmetro ou em função da menor eficiência de recobrimento, por conta da rápida velocidade de reação e reticulação das partículas emulsificadas. Esse efeito do DVB no meio reacional também pode explicar a menor quantidade de partículas de menor diâmetro observadas na reação em que menor teor de DVB foi empregado.

Ao observar as partículas produzidas a partir da reação em que foi feita a alimentação de uma miniemulsão, percebe-se o aumento pronunciado de partículas de menor diâmetro, possivelmente em função da maior estabilidade da emulsão e menor grau de aglomeração das partículas emulsificadas ao núcleo. Esse resultado pode ser considerado inadequado para fins de preparação do suporte e reforça a ideia de formar a emulsão *in-situ*. Portanto, parece conveniente que a fase que forma a casca seja tão instável quanto possível, para permitir a aglomeração controlada sem formação de coágulo.

Contudo, ao analisar apenas o diâmetro médio dos suportes produzidos, não foi possível fazer qualquer distinção entre as diferentes partículas produzidas, como mostrado na Figura 41.



**Figura 40.** Distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo produzidas no terceiro bloco de experimentos.



**Figura 41.** Diâmetro médio das partículas casca-núcleo produzidas no terceiro bloco de experimentos.

As características morfológicas de cada um dos diferentes suportes produzidos foram avaliadas (área específica, volume específico de poros e diâmetro médio de poros) e são apresentadas na Tabela 13.

**Tabela 13.** Características morfológicas das partículas casca-núcleo obtidas no terceiro bloco de experimentos.

Reação	Legenda	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)	Volume Específico de Poros (cm <sup>3</sup> /g)	Diâmetro Médio de Poro (Å)
07	V=0,069 L/h	33,4	0,16	197,2
08	Menor Conversão (1 h)	27,2	0,13	181,0
09	Menor Teor de DVB (5%)	12,9	0,07	233,3
10	Alimentação de Miniemulsão	20,0	0,09	183,7
11	Menor Conversão (0,67 h)	48,2	0,30	253,1
15	Menor Conversão (0,67 h) – Duplicata	48,4	0,28	240,6
16	Menor Conversão (0,67 h) e Maior Teor de DVB	51,4	0,29	243,6
Comercial	Accurel	27,4	0,15	189,1
Comercial	Novozym 435	89,3	0,51	227,0

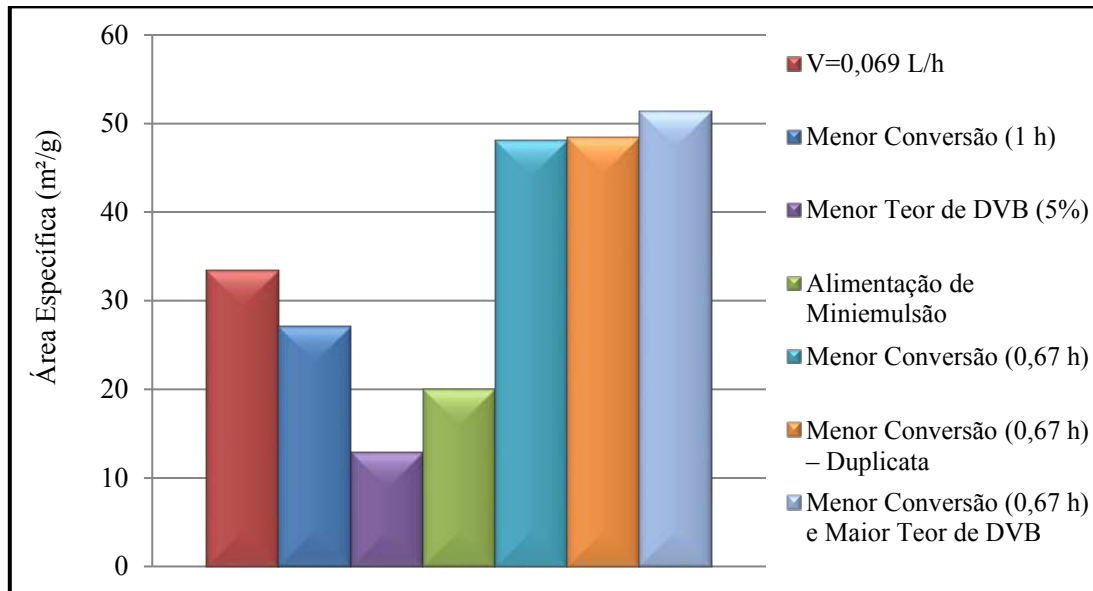
Ao observar os valores encontrados para o diâmetro médio de poros, percebe-se que as diferentes partículas apresentam poros largos e apropriados para aplicação como suporte em imobilização de enzimas. Dessa forma, um enfoque maior será dado para a influência das condições operacionais na área específica das partículas produzidas. Com o objetivo de facilitar a comparação dos diferentes resultados obtidos neste terceiro bloco de experimentos, é apresentada a Figura 42. Pode-se notar que a reação em que o menor teor de DVB foi empregado resultou em partículas com as menores áreas específicas. Ou seja, é notório que a adição de divinilbenzeno ao meio reacional é importante para a obtenção de partículas com áreas específicas expressivas. Na reação em que a miniemulsão foi alimentada foram obtidas partículas com baixas áreas específicas, provavelmente por causa de maior estabilidade da miniemulsão, resultando possivelmente em um menor recobrimento dos núcleos poliméricos.

Ao analisar a estratégia de redução do período da etapa em suspensão, é possível observar também que as partículas sintetizadas com menor tempo de reação (1 h) apresentaram valores de área específica próximos do valor encontrado para a reação de referência ( $V=0,069$  L/h). No entanto, quando a alimentação da emulsão ocorreu em estágio de ainda menor conversão dos núcleos (0,67 h de reação em suspensão) (Reações 11 e 15), partículas com áreas específicas pronunciadas foram produzidas (área específica de  $48$  m<sup>2</sup>/g e porosidade igual a  $0,30$  cm<sup>3</sup>/g). Ou seja, a menor duração da etapa em suspensão resulta em núcleos mais adesivos (em função da menor conversão), garantindo uma captura mais eficiente das partículas emulsificadas, resultando em maiores recobrimentos e, conseqüentemente, áreas específicas ainda mais expressivas. A adição de maior teor de DVB (Reação 16) provocou o aumento de partículas de menor diâmetro, resultando em suportes com áreas específicas ainda mais pronunciadas. Nenhum estudo anterior baseado na técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas resultou em partículas com áreas específicas tão pronunciadas, iguais a  $51$  m<sup>2</sup>/g.

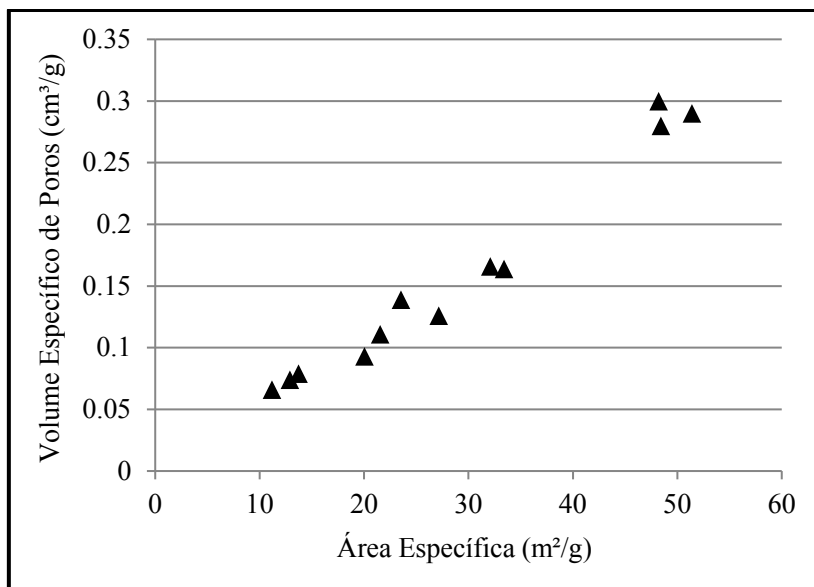
No entanto, percebe-se que o biocatalisador comercial, *Novozym 435*, apresenta as maiores área específica e porosidade encontradas, incentivando o aprofundamento de novas estratégias para a obtenção de suportes ainda mais porosos. Ainda assim, ao analisar o resultado obtido para o suporte comercial, *Accurel*, percebe-se que a maior parte das partículas casca-núcleo produzidas apresentou áreas específicas mais elevadas. Outro suporte comercial também empregado em diversos trabalhos da literatura, à base de metacrilato de octadecila, apresenta área específica de  $25$  m<sup>2</sup>/g (TACIAS-PASCACIO

*et al.*, 2016); valor também inferior aos diversos resultados obtidos. Dessa forma, é possível afirmar que ambas as estratégias adotadas (menor duração da etapa em suspensão e aumento do teor de DVB) resultaram em resinas com potencial aplicação como suportes enzimáticos.

Para confirmar a relação existente entre a área específica e o volume específico de poros das partículas casca-núcleo observada no primeiro bloco de experimentos e no estudo desenvolvido por PINTO (2013), é mostrada a Figura 43. Nota-se que a linearidade entre ambas as variáveis é mantida; ou seja, o aumento da área específica é associado principalmente ao aumento de partículas emulsificadas aglomeradas e depositadas sobre o núcleo.



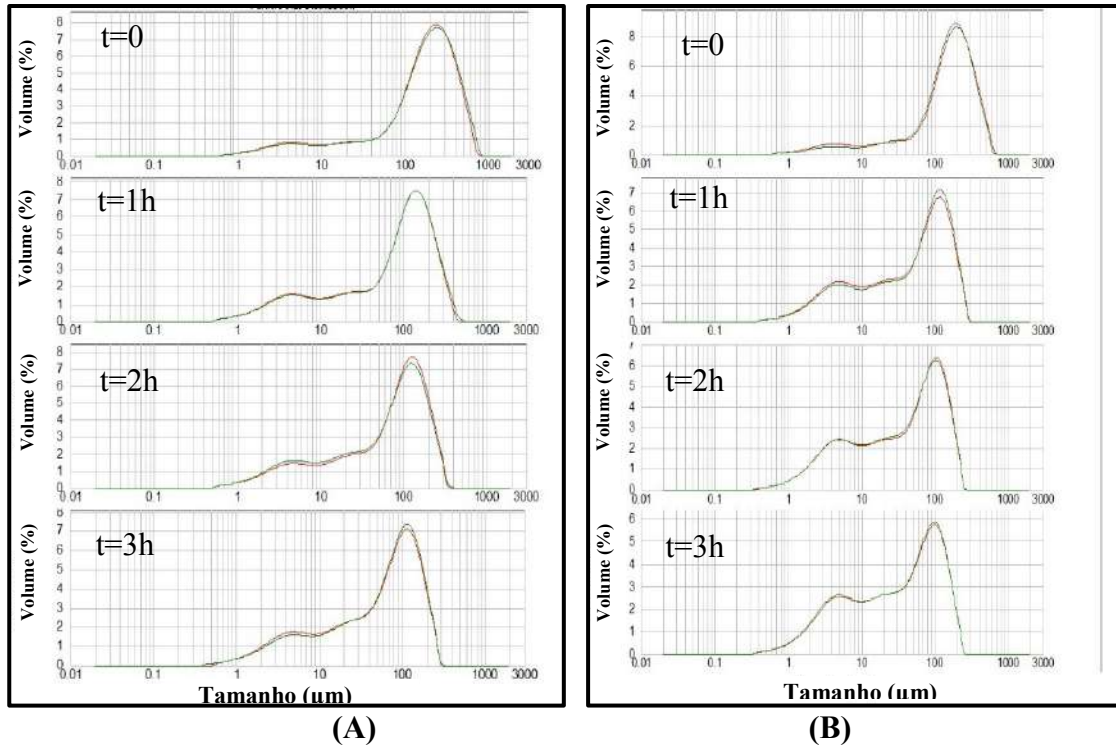
**Figura 42.** Área específica das partículas casca-núcleo obtidas no terceiro bloco de experimentos.



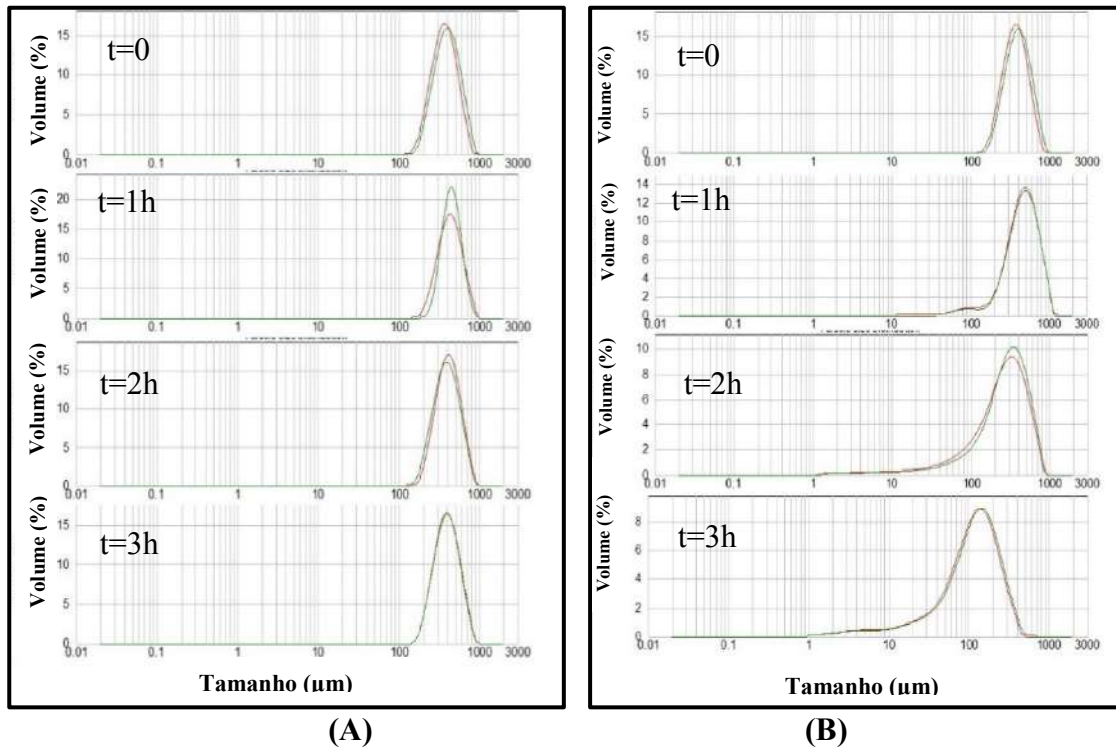
**Figura 43.** Relação existente entre a área específica e o volume específico de poros das partículas casca-núcleo produzidas.

#### 2.3.3.5. Resistência Mecânica das Partículas Produzidas

Como mencionado anteriormente, a avaliação da estabilidade mecânica dos suportes poliméricos é fundamental, uma vez que o objetivo principal do presente trabalho é o desenvolvimento de biocatalisadores que possam ser empregados em diferentes ciclos de reação. Dessa forma, seguindo a metodologia apresentada na **Seção 2.3.1.6**, foi analisada a resistência mecânica do suporte produzido que apresentou maior área específica (Reação 16: Menor Conversão (0,67 h) e Maior Teor de DVB). Para efeito comparativo, foi também avaliado o biocatalisador comercial *Novozym 435*. Nesta seção os suportes foram submetidos às velocidades extremas de agitação (200 rpm e 800 rpm) ao longo de 3 h. Os resultados encontrados são apresentados nas Figuras 44 e 45.



**Figura 44.** Distribuição de tamanhos de partícula (Reação 16; Menor Conversão (0,67 h) e Maior Teor de DVB) empregando-se uma velocidade de agitação igual a: **(A)** 200 rpm; **(B)** 800 rpm.



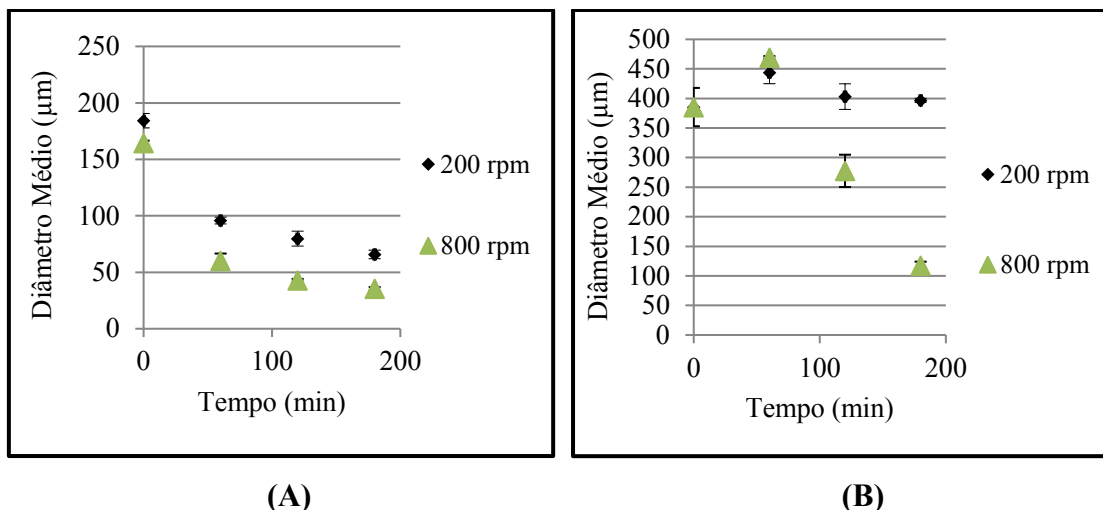
**Figura 45.** Distribuição de tamanhos de partículas da *Novozym 435* empregando-se uma velocidade de agitação igual a: **(A)** 200 rpm; **(B)** 800 rpm.

É possível perceber para as partículas casca-núcleo um leve aumento da fração de partículas de menor diâmetro, quando a velocidade de agitação de 200 rpm é imposta ao sistema. Ao analisar os resultados encontrados para o biocatalisador comercial, nota-se que o aumento de partículas de menor diâmetro só ocorre quando a velocidade do sistema é de 800 rpm. Dessa forma, aparentemente, as partículas do biocatalisador comercial apresentam resistência mecânica mais elevada que as partículas casca-núcleo produzidas.

A menor resistência mecânica das partículas casca-núcleo fica mais evidenciada ao comparar os diâmetros médios das partículas durante a agitação, como mostrado na Figura 46. No entanto, a queda do diâmetro médio das partículas do biocatalisador comercial também ocorre de forma pronunciada após o sistema ser submetido a agitação de 800 rpm por 3h. Já para as partículas casca-núcleo, ocorre uma queda pronunciada no diâmetro médio após 1 h, mesmo a uma velocidade de 200 rpm. Portanto, a questão da estabilidade mecânica é também relevante para o produto comercial.

Ao comparar os resultados encontrados para as partículas casca-núcleo de maior área específica (Reação 16) com os já mostrados para as partículas produzidas na **Seção 2.3.1.6.** (Reação 2), percebe-se que, apesar do aumento observado na área específica dos suportes, aparentemente tais partículas apresentam uma diminuição na resistência mecânica. Esse resultado pode ser explicado pela menor resistência mecânica de partículas mais porosas, como já reportado na literatura (GOKMEN e DU PREZ, 2012). No entanto, é importante ressaltar que é possível que tal resultado não altere de forma pronunciada o desempenho do biocatalisador, uma vez que agitações menos vigorosas são geralmente impostas ao sistema. Assim, uma análise mais profunda, empregando tensões de cisalhamento semelhantes às utilizadas durante o uso propriamente dito do biocatalisador, faz-se necessária, de forma a avaliar a resistência mecânica das partículas casca-núcleo nas condições reais de operação.





**Figura 46.** Comparação entre os diâmetros médios das partículas: **(A)** Casca-núcleo (Reação 16); **(B)** *Novozym 435*.

## 2.4. Conclusões Parciais

Primeiramente foi observado que o efeito da vazão de alimentação de comonômeros sobre a morfologia das partículas casca-núcleo foi semelhante ao observado em sistemas à base apenas de estireno, havendo uma vazão ótima que resulta em suportes com áreas específicas e porosidades pronunciadas. Dessa forma, percebeu-se que a composição química do sistema de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, a depender da propriedade do suporte que está sendo analisada, pode afetar apenas os valores absolutos de tais propriedades, e não o comportamento qualitativo observado quando variáveis operacionais são alteradas, como no caso da vazão de alimentação.

Além disso, foi observado que a adição de divinilbenzeno ao sistema provoca o aumento da resistência mecânica das partículas casca-núcleo produzidas e que o aumento da área específica de tais suportes é acompanhado por uma diminuição na sua resistência mecânica. No entanto, novas análises precisam ser realizadas com o objetivo de obter resultados mais conclusivos em condições que simulem condições reais de operação.

Foi percebido também haver correlação linear quando se relacionam as áreas específicas e os volumes específicos de poro das partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno), resultado semelhante ao já observado para as partículas de poliestireno. Este resultado indica que o aumento da área específica das partículas está associado

principalmente à quantidade de partículas depositadas sobre o núcleo e não à morfologia das mesmas.

Com base em tudo que foi exposto, ficou evidente a necessidade de adicionar divinilbenzeno como comonômero para a obtenção de partículas com áreas específicas e porosidades mais pronunciadas. Notou-se também que a alimentação de uma miniemulsão resulta em partículas emulsificadas mais estáveis, diminuindo a eficiência de recobrimento dos núcleos poliméricos e, conseqüentemente, gerando suportes com menores áreas específicas. Já a alimentação da emulsão em instantes iniciais da reação em suspensão combinada com um aumento no teor de DVB no meio reacional resulta em partículas com áreas específicas e porosidades expressivas, atingindo valores de 50 m<sup>2</sup>/g, nunca obtidos para partículas casca-núcleo produzidas por esse sistema de polimerização.

## ***2.5. Materiais e Metodologias em Escala Piloto***

Esta seção visa a descrever os materiais e a metodologia empregados nas reações de polimerização das partículas poliméricas com morfologia casca-núcleo em escala piloto. A técnica utilizada para a determinação do grau de hidrofobicidade das partículas produzidas também é apresentada.

### ***2.5.1. Materiais***

Nesta etapa do trabalho, foi empregado para síntese dos suportes, o comonômero estireno (S) (destilado sob vácuo antes do uso), fornecido pelo INNOVA S/A. O divinilbenzeno (DVB), também utilizado como comonômero, foi fornecido pela Sigma Aldrich Ltda., com grau técnico de 80% (contendo 20% de etilestireno). O comonômero metacrilato de metila foi adquirido da Unigel S/A, contendo 30 ppm de hidroquinona. Todos os outros reagentes e solventes utilizados no processo polimerização já foram descritos na ***Seção 2.2.1***. Vale ressaltar que todos os reagentes foram utilizados como recebido, sem haver qualquer etapa intermediária de purificação.

### ***2.5.2. Metodologia em Escala Piloto***

O processo de escalonamento foi realizado na Planta Piloto do Laboratório de Engenharia de Polimerização (EngePol/COPPE). As reações foram realizadas em um reator de 12 L, visando à síntese de aproximadamente 1 a 1,5 kg de partículas com morfologia casca-núcleo por batelada. A Figura 47 ilustra a unidade utilizada para condução da reação em suspensão e emulsão simultâneas em escala piloto.

Nesta etapa do trabalho, diversas estratégias foram adotadas com o objetivo de sintetizar suportes com maiores áreas específicas e porosidades, baseando-se nos resultados obtidos em escala de bancada. É importante destacar que buscou-se alterar minimamente as quantidades de cada um dos componentes, de forma a manter as condições reacionais o mais próximo possível das condições descritas no processo conduzido em menor escala. Vale salientar, contudo, que algumas condições operacionais, como temperatura e velocidade de alimentação de comonômeros, e teores de alguns compostos foram modificados em algumas reações, de forma a avaliar tal efeito no sistema de polimerização. É importante pontuar que o estudo do processo de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas em larga escala foi realizado pela primeira vez no presente trabalho.

As reações em larga escala foram realizadas em um reator de aço inoxidável de 12 L (Implantação, Rio de Janeiro, Brasil) provido de 3 chicanas retas a 120° uma da outra ao longo da circunferência do reator. Foi acoplada ao reator uma corrente de água quente, usada para controlar a temperatura do reator. Todas as reações foram conduzidas sob agitação contínua e igual a 800 rpm. Durante o estudo em larga escala, foram avaliadas composições e condições de reação distintas. Partículas de PMMA/PMMA; P(S-co-DVB)/P (S-co-DVB) (25% m/m de DVB) e P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB) (25% m/m de DVB) foram sintetizadas.



**Figura 47.** Unidade em escala piloto utilizada para a produção das partículas com morfologia casca-núcleo.

Em todas as reações, inicialmente uma solução orgânica (20 - 25% m/m) (contendo a mistura de monômeros e o iniciador, peróxido de benzoíla - BPO) era dispersa numa solução aquosa (contendo água destilada e 0,6% m/m de poli(álcool vinílico), utilizado como agente de suspensão). Nas reações em que MMA foi empregado, por ser muito reativo e para evitar qualquer tipo de descontrole térmico, a quantidade de BPO foi diminuída para 0,25 % m/m. Nos demais sistemas, o conteúdo da BPO foi fixado em 0,8% m/m. Vale ressaltar que todas as percentagens mássicas apresentadas correspondem à percentagem mássica total.

Após um determinado período da reação em suspensão, os componentes da emulsão eram adicionados ao meio reacional. A quantidade total de água era de aproximadamente 74 % m/m. O conteúdo do bicarbonato de sódio, utilizado como agente tamponante, era em torno de 0,04 a 0,06 % m/m. Já o teor de lauril sulfato de sódio oscilou em torno de 0,3 a 0,4 % m/m. A carga inicial da mistura monomérica, assim como na escala de bancada, era de 4% em relação à massa total do meio reacional e era adicionada no início da reação. O teor de persulfato de potássio, iniciador da segunda etapa de reação, era de 0,1 % m/m, quando MMA era utilizado como monômero, e entre 0,03 e 0,04 % m/m nas demais reações. A alteração do teor de iniciador na etapa de emulsão visou a afetar a conversão das nanopartículas e sua adesão aos núcleos. O restante da mistura monomérica era adicionado continuamente à reação durante a etapa de emulsão alimentada (7 - 9 % m/m). A alimentação dos monômeros, durante a segunda etapa da

reação, era garantida pela utilização de bombas dosadoras (Prominent, modelo GALA1000SST000UA002100; com cabeça de bombeamento de aço inox). A massa final do meio reacional foi de aproximadamente 8 a 9 kg, a depender da reação realizada.

Após o término da alimentação, mais duas horas de reação em emulsão eram conduzidas, de forma a assegurar a cobertura dos núcleos pelas partículas emulsificadas e a garantir a formação da casca porosa. Ao final da reação de polimerização, o reator era resfriado até a temperatura ambiente e as partículas eram lavadas e secas, utilizando liofilizadores industriais

Vale ressaltar que a duração da polimerização em suspensão não foi a mesma para todas as reações. Essa alteração objetivou aumentar a porosidade das partículas, a depender do monômero empregado e da característica de cada sistema de polimerização. A temperatura de reação também foi diminuída quando o MMA foi utilizado como comonômero, devido a sua elevada reatividade. Além disso, o fluxo de alimentação do monômero foi ligeiramente alterado, uma vez que se sabe que essa variável afeta a porosidade das partículas casca-núcleo (PINTO, 2013; PINTO *et al.*, 2014). As condições operacionais de cada reação de polimerização realizada em larga escala são apresentadas na Tabela 14. As condições da Reação 11 (descrita na **Seção 2.3.3**) são mostradas para efeito comparativo, sendo chamada de Reação Referência. Esta reação resultou em partículas com área específica e porosidade elevadas com menores gastos de DVB, reagente de custo elevado.

**Tabela 14.** Condições operacionais das reações realizadas em larga escala.

Reação	Composição Química	Temperatura (°C)	$\Delta t$ suspensão (min)	Vazão de Monômero (L.h <sup>-1</sup> .g <sup>-1</sup> )*	Escala
Referência: Reação 11	P(S-co-DVB)/ P(S-co-DVB) (25 % DVB)	85	40	0,0007	Bancada
Piloto_1	PMMA/ PMMA	(65-75)	60	0,0004	Piloto
Piloto_2	PMMA/PMMA	(65-75)	70	0,0004	Piloto
Piloto_3	PMMA/PMMA	70	70	0,0003	Piloto
Piloto_4	P(MMA-co-DVB)/ P(MMA-co-DVB) (25 % DVB)	75	25	0,0007	Piloto
Piloto_5	P(S-co-DVB)/ P(S-co-DVB) (25 % DVB)	80	40	0,0007	Piloto

\* A vazão de monômero foi dividida pela quantidade de monômero empregada na etapa da suspensão, de forma a facilitar a comparação entre as reações conduzidas em escala bancada e piloto.

### ***2.5.3. Caracterização das Partículas Poliméricas***

Com o objetivo de caracterizar as partículas casca-núcleo produzidas em larga escala, inúmeras análises foram realizadas: microscopia óptica, microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento de luz, análise de área específica, diâmetro médio de poro e volume específico de poros por fisissorção de nitrogênio. É descrita nesta seção a análise empregada para inferir o grau de hidrofobicidade das partículas produzidas. Tal análise não era relevante até então, uma vez que a composição das partículas produzidas era a mesma.

#### ***2.5.3.1. Determinação do Ângulo de Contato***

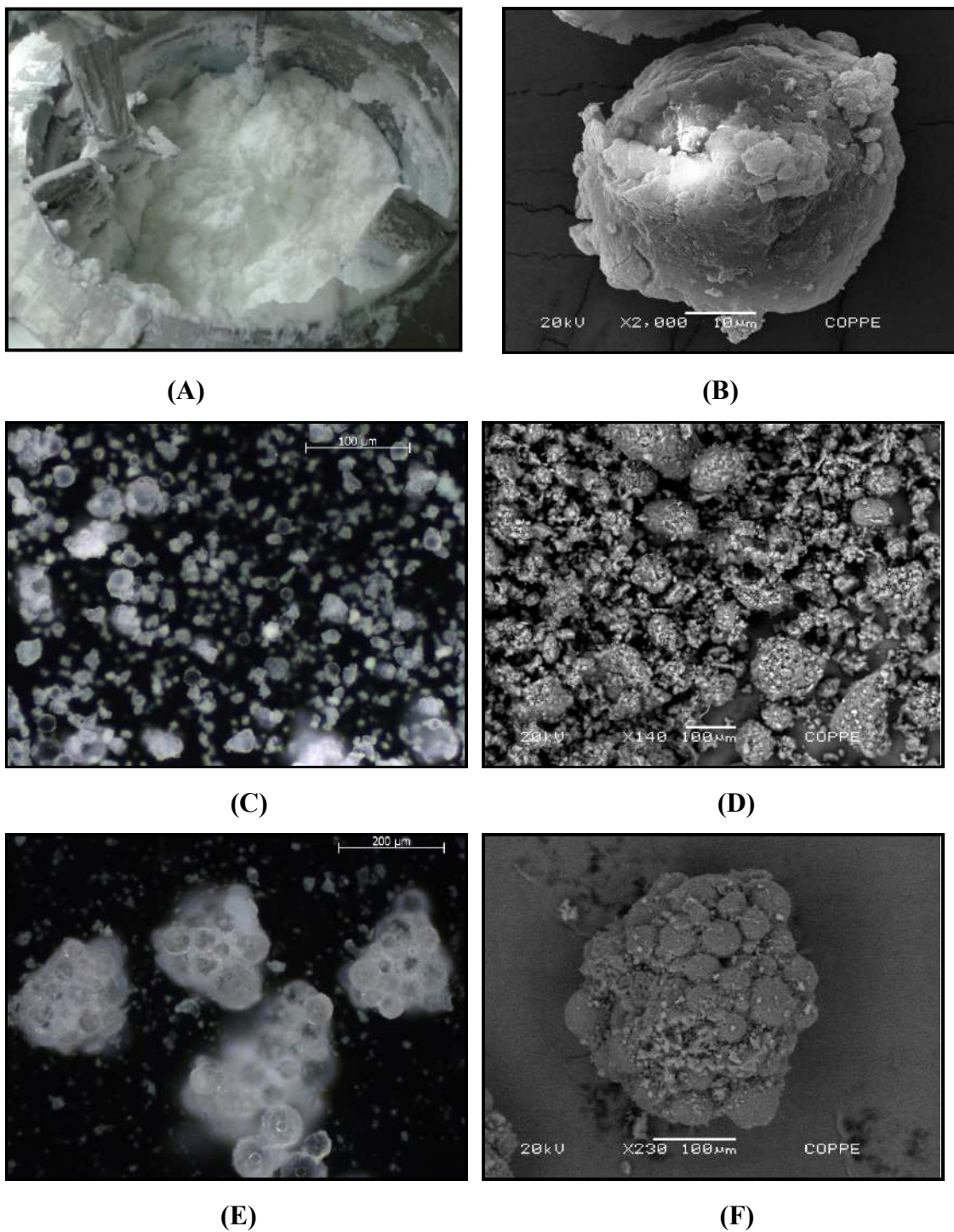
O ângulo de contato é definido como o ângulo formado pela interseção da interface líquido-sólido e pela interface líquido-vapor. São observados valores de ângulo de contato pequenos, quando o líquido se espalha sobre a superfície; enquanto valores elevados são encontrados, quando o fluido se contrai na forma de gota, minimizando a interação com a superfície. Assim, valores de ângulo de contato superiores a 90° indicam que a molhabilidade da superfície pela água é desfavorecida (superfície hidrofóbica). Já a superfície hidrofílica apresenta ângulo de contato menor que 90°, indicando que a molhabilidade é favorável (YUAN e LEE, 2013). Essa característica superficial dos materiais afeta diretamente a interação das partículas poliméricas com as enzimas a serem adsorvidas.

Dessa forma, para determinar o grau de hidrofobicidade dos materiais poliméricos produzidos, utilizou-se um tensiômetro (Kruss Process, modelo K100). Inicialmente, as partículas casca-núcleo eram comprimidas em um modelo de disco, utilizando-se uma prensa, formando pastilhas. Em seguida, cada amostra era colocada na balança do equipamento, com o auxílio de uma pequena garra (acessório próprio do equipamento). As pastilhas poliméricas eram, então, imersas em um recipiente contendo água destilada e o ângulo de contato estabelecido entre a pastilha e a água destilada, medido em condições atmosféricas a 25 °C, era determinado. Tal ângulo é usado como uma inferência do grau de hidrofobicidade das partículas poliméricas. As análises foram feitas em duplicata.

## ***2.6. Resultados em Escala Piloto***

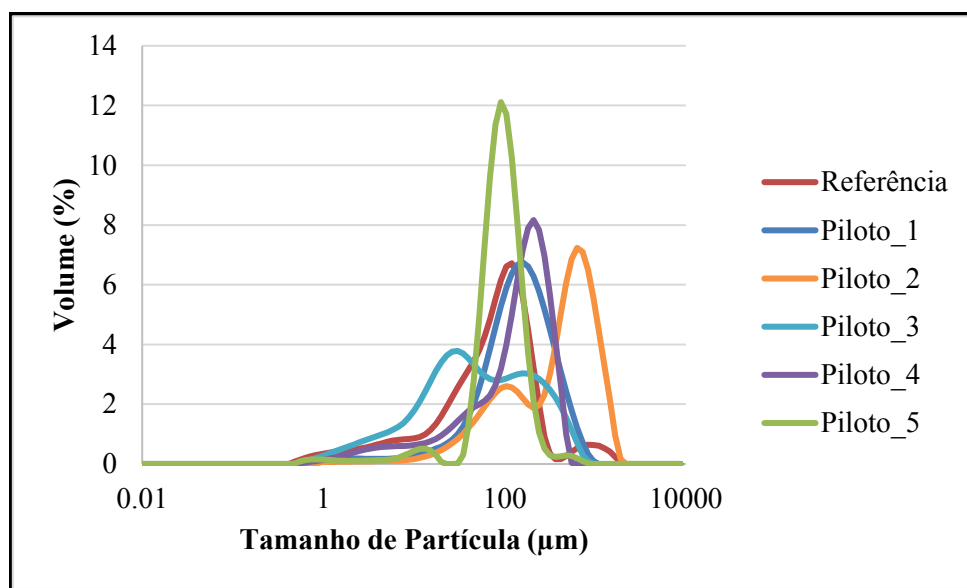
Diferentes suportes poliméricos com morfologia casca-núcleo foram sintetizados em larga escala, como mostrado na Figura 48. É possível observar nas Figuras 48 A e 48 B que foram obtidas partículas esféricas porosas já na reação Piloto\_1. A reação Piloto\_3 (PMMA/PMMA) aparentemente resultou em partículas menores, como observado nas Figuras 48 C e 48 D. Nota-se também, nas Figuras 48 E e 48 F, a intensa formação de aglomerados na reação Piloto\_4, provavelmente em função da menor estabilidade do sistema polimérico.

As distribuições de tamanhos de partícula de cada suporte polimérico produzido são apresentadas na Figura 49. Inicialmente, observa-se que este tipo de reação de polimerização resulta em distribuições de tamanhos de partícula largas, independentemente da composição química do meio reacional. Pode-se notar também que a distribuição de tamanhos de partícula da reação Piloto\_2 apresentou maior teor de partículas de maior diâmetro. Provavelmente, as condições de reação favoreceram a uma maior aglomeração dos suportes produzidos, resultando em aumento de partículas de diâmetro maiores. Em contrapartida, é possível observar que a reação Piloto\_3 resultou em maior quantidade de partículas de menor diâmetro. Dessa forma, é evidente que pequenas mudanças nas condições operacionais das reações, como a vazão de alimentação de monômero, afetam a morfologia final das partículas produzidas e podem ser usadas para o projeto do suporte.



**Figura 48.** Morfologia dos suportes poliméricos produzidos: **(A)** Partículas obtidas ao final da reação Pilot\_1 (PMMA/PMMA); **(B)** MEV da partícula produzida a partir da reação Pilot\_1 (PMMA/PMMA); **(C)** MO das partículas produzidas na reação Pilot\_3 (PMMA/PMMA); **(D)** MEV das partículas produzidas na reação Pilot\_3 (PMMA/PMMA); **(E)** MO das partículas produzidas na reação Pilot\_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)); **(F)** MEV dos aglomerados formados na reação Pilot\_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)).





**Figura 49.** Distribuição de tamanhos de partícula dos suportes sintetizados em larga escala.

De forma a facilitar a compreensão do efeito das condições de polimerização no diâmetro das partículas sintetizadas, os diâmetros médios dos suportes produzidos são apresentados na Tabela 15. Ao comparar os resultados obtidos para a reação de Referência e a reação Piloto\_5, percebe-se que o diâmetro médio das partículas de P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) sintetizadas em pequena e larga escala foram semelhantes, indicando que o equilíbrio existente entre as taxas de ruptura e de coalescência das partículas foram mantidos no reator em escala piloto e que a taxa de aglomeração das partículas produzidas não foi afetada.

É possível observar, também na Tabela 15, que diferentes diâmetros médios de partícula foram obtidos para as reações à base de MMA, reforçando a hipótese de que não só a composição química afeta a distribuição de tamanhos das partículas casca-núcleo sintetizadas por polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, mas também as condições operacionais. Ao comparar as reações Piloto\_3 e Piloto\_2, nota-se que o aumento da vazão de alimentação de monômero durante a etapa de emulsão provocou o aumento da aglomeração das partículas (resultando em partículas com maiores diâmetros médios, como observado na **Seção 2.3.1** para partículas à base de P(S-co-DVB) produzidas em escala de bancada). Além disso, ao comparar os valores encontrados para as reações Piloto\_1 e Piloto\_2, é possível observar que, para o sistema à base de MMA a

condução da etapa da suspensão por 1 h resultou em partículas menos aglomeradas ao final da polimerização. Vale ressaltar que todas as reações resultaram em partículas que puderam ser facilmente separadas do meio reacional por um processo trivial de filtração, contribuindo para o emprego eficiente dos suportes poliméricos na produção de biocatalisadores. Portanto, as reações estudadas parecem ser facilmente escalonáveis, o que constitui conclusão muito relevante para o desenvolvimento comercial desse produto.

**Tabela 15.** Diâmetro médio das partículas casca-núcleo produzidas em larga escala.

Suportes	Diâmetro Médio das Partículas ( $d_{50}$ ) ( $\mu\text{m}$ )
Reação Referência: P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)	$86,1 \pm 12,1$
Piloto_1 (PMMA/PMMA)	$157,2 \pm 47,1$
Piloto_2 (PMMA/PMMA)	$481,4 \pm 96,9$
Piloto_3 (PMMA/PMMA)	$49,1 \pm 5,7$
Piloto_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB))	$163,5 \pm 4,7$
Piloto_5 (P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB))	$98,9 \pm 1,2$

Na Tabela 16 são apresentadas as características morfológicas das partículas produzidas, incluindo a área específica, o diâmetro médio de poros, o volume específico de poros e grau de hidrofobicidade dos materiais poliméricos, inferido pela determinação do ângulo de contato entre cada material e água destilada, como mencionado anteriormente.

Com base nos resultados obtidos, é evidente a síntese de partículas porosas a partir das diferentes reações realizadas, havendo a formação eficaz da casca polimérica ao redor do núcleo em todas as reações, uma vez que a área específica dos núcleos é aproximadamente igual a zero (PINTO *et al.* 2014; MANOEL *et al.*, 2016b).

**Tabela 16.** Características morfológicas dos suportes produzidos em larga escala.

Suportes	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)	Diâmetro Médio de Poro (Å)	Volume Específico de Poros (m <sup>3</sup> /g)	Ângulo de Contato (°)
Reação Referência (P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB))	48,2	253,1	0,29	92,3 ± 0,4
Piloto_1 (PMMA/PMMA)	29,9	176,4	0,15	55,9 ± 0,1
Piloto_2 (PMMA/PMMA)	7,5	190,9	0,04	31,6 ± 0,2
Piloto_3 (PMMA/PMMA)	44,5	211,6	0,27	56,6 ± 0,5
Piloto_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB))	27,0	222,1	0,16	- *
Piloto_5 (P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB))	5,3	253,3	0,03	105,7 ± 0,8

\* O ângulo de contato dessa amostra não pôde ser detectado.

Ao comparar as reações de P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) em escala bancada (Reação Referência) e em escala piloto (Piloto\_5), percebe-se que a casca porosa não foi formada de forma tão eficiente na reação em larga escala. Provavelmente a diminuição da temperatura da reação afetou a conversão dos monômeros e a cobertura adequada dos núcleos. A reação Piloto\_3 (PMMA/PMMA) resultou em suportes com as maiores área específica e porosidade, indicando que as condições operacionais empregadas nesta reação foram as mais apropriadas, considerando a síntese de suportes porosos para imobilização enzimática. Além disso, a maior aglomeração das partículas poliméricas obtidas nas reações Piloto\_1 e Piloto\_2 (uma vez que maiores diâmetros médios foram observados) resultou em uma diminuição da área específica das mesmas. É importante ressaltar que o suporte à base de P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB) também apresentou área específica satisfatória, maior inclusive que a de alguns suportes comerciais apontados nas seções anteriores. Vale mencionar que o valor encontrado correspondeu a aproximadamente o dobro da área específica reportada por CUNHA *et al.* (2014) para partículas de mesma composição produzidas em escala de bancada empregando-se 2h de reação em suspensão. É importante apontar que os suportes com as

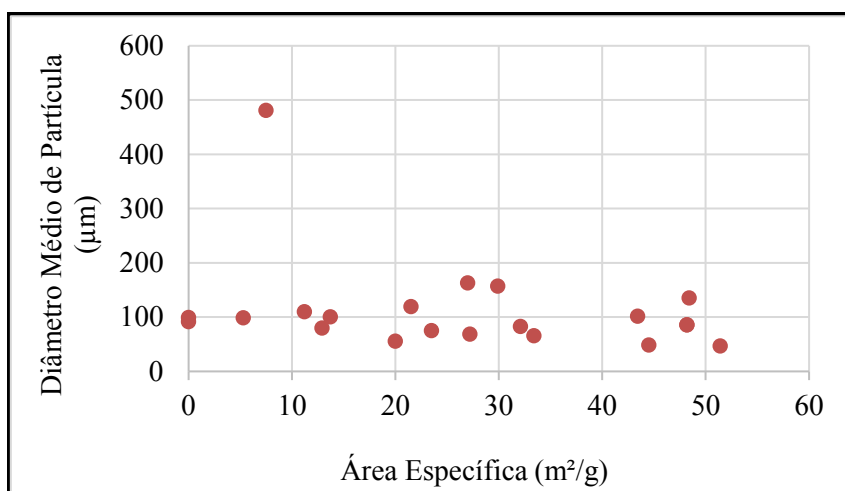
maiores áreas específicas também exibiram alta porosidade, como esperado e discutido na **Seção 2.3.3.4**.

O diâmetro médio de poros de cada suporte também é apresentado na Tabela 16. Percebe-se que todos os suportes apresentaram diâmetro médio dos poros largos o suficiente para permitir o acesso da enzima às regiões mais internas da casca porosa, incluindo os suportes produzidos a partir das reações de maior área, Reação Referência e Piloto\_3.

É importante observar na Tabela 16 que as partículas produzidas exibiram características hidrofóbicas (ângulo de contato acima de 90°) e hidrofílicas (ângulo de contato abaixo de 90°). Como mostrado por CUNHA *et al.* (2014), essas características hidrofóbicas afetam significativamente o processo de imobilização enzimática. Como será detalhado no próximo capítulo, os suportes que apresentam características hidrofóbicas possibilitam o fenômeno de ativação interfacial das lipases durante o procedimento de imobilização, contribuindo para o aumento da atividade do biocatalisador. Ao analisar a tabela, percebe-se também que amostras com a mesma composição exibem diferentes valores de ângulo de contato. Esta divergência pode ser justificada pela presença de surfactante residual na superfície das partículas, alterando o grau de hidrofilicidade dos suportes. Tal discrepância pode ocorrer também em função do caráter rugoso e irregular da superfície dessas partículas e, conseqüentemente, das pastilhas produzidas, interferindo na medida do ângulo de contato formado com a água (YUAN e LEE, 2013). Esse aspecto precisa ser considerado de forma cuidadosa durante a análise.

É importante notar que também foram produzidos suportes com superfícies mais hidrofílicas, os suportes compostos por metacrilato de metila, uma vez que o MMA contém um grupamento éster. Embora as superfícies hidrofílicas não favoreçam a ativação interfacial, dependendo do meio reacional o grau de hidrofilicidade dos suportes pode facilitar os mecanismos de difusão de substratos e produtos, aumentando a atividade enzimática do biocatalisador produzido.

Na Figura 50 é mostrada a relação existente entre o diâmetro médio de partícula e a área específica de tais partículas. Dessa forma, é possível observar que a diminuição do tamanho médio das partículas não é suficiente para a obtenção de partículas com áreas específicas mais pronunciadas. Percebe-se que a eficiência na formação da casca polimérica é fundamental para o aumento da área específica e da porosidade dos suportes.



**Figura 50.** Relação existente entre o diâmetro médio de partícula e a área específica de tais partículas.

## 2.7. Conclusões Parciais

Com base em tudo que foi exposto, fica evidente a necessidade de adicionar divinilbenzeno como comonômero para a obtenção de partículas com áreas específicas e porosidades mais pronunciadas. Além disso a adição de divinilbenzeno provoca um aumento da resistência mecânica das partículas casca-núcleo produzidas. Percebeu-se também que a alimentação da emulsão em instantes iniciais da reação em suspensão resulta em partículas com áreas específicas e porosidades expressivas, atingindo valores ao redor de 50 m<sup>2</sup>/g, nunca obtidos para partículas casca-núcleo produzidas por esse sistema de polimerização.

Novos suportes com morfologia casa-núcleo, apresentando composições distintas, foram produzidos em escala piloto. O estudo de escalonamento do processo de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas foi conduzido de forma satisfatória, apresentando resultados promissores para a produção comercial desses materiais.

Para realizar o estudo subsequente de imobilização enzimática, foram selecionadas inicialmente as partículas do núcleo, as nanopartículas formadoras da casca e as correspondentes partículas casca-núcleo (apresentadas no segundo bloco de experimentos), com o objetivo de avaliar o desempenho das partículas produzidas por suspensão e emulsão simultâneas na síntese de biocatalisadores. Além disso, o suporte que exibiu maior área dentre os suportes produzidos em escala de bancada também foi

selecionado: Reação 16 P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB). Dentre os suportes produzidos em escala piloto, foram ainda selecionados os suportes que exibiram composições químicas distintas: PMMA/PMMA (Piloto\_1); P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB) (Piloto\_4); P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) (Piloto\_5). As isotermas de fisissorção de nitrogênio dos suportes produzidos e empregados no processo de imobilização são mostradas no *Apêndice C*.

## ***Capítulo III***

# **Imobilização Enzimática**

O presente capítulo aborda as etapas referentes à imobilização enzimática e à avaliação dos biocatalisadores produzidos. Assim na Seção 3.1 são apresentados os diferentes métodos de imobilização de enzimas, sendo descritos com mais detalhe os procedimentos que empregam suportes. Vale salientar que um maior enfoque é dado aos trabalhos que descrevem o processo de síntese de tais suportes, almejando empregá-los no processo de imobilização enzimática. Nesse contexto, os trabalhos encontrados que produziram suportes a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas para posterior síntese de biocatalisadores são detalhados. Na Seção 3.2 são apresentados os materiais utilizados, a metodologia e as técnicas de caracterização envolvidas na etapa de imobilização da enzima estudada, lipase B de *Candida antarctica*. Os procedimentos de avaliação de desempenho dos biocatalisadores produzidos também são mostrados. Na Seção 3.3 são apresentados os resultados encontrados ao empregar as partículas poliméricas produzidas como suporte na síntese de biocatalisadores e o desempenho de tais enzimas imobilizadas. Por fim, na Seção 3.4, são apresentadas as conclusões obtidas com base nos resultados mostrados.

### ***3.1. Revisão Bibliográfica***

#### ***3.1.1. Métodos de Imobilização Enzimática***

O desenvolvimento de processos sustentáveis e menos danosos ao meio ambiente é uma importante necessidade atual, como já foi mencionado. As enzimas, por serem “catalisadores sustentáveis” e obtidas a partir de fontes renováveis e biodegradáveis, têm atraído a atenção tanto da academia quanto da indústria. Esses biocatalisadores muitas vezes exibem altas taxas de reação, com elevada seletividade, e são mais eficientes energeticamente, uma vez que permitem a condução de processos sob condições mais suaves de temperatura e pressão. Nesse contexto, uma das ferramentas que viabilizam a implantação desses bioprocessos em escala comercial é a imobilização enzimática. O

procedimento de imobilizar enzimas visa a torná-las insolúveis no meio reacional. Quando comparada ao emprego de enzimas na forma solúvel, a técnica de imobilização destaca-se por possibilitar o aumento da estabilidade enzimática, tanto operacional (menos sensível às condições operacionais) quanto durante a estocagem; permitir a reutilização desses biocatalisadores; possibilitar maior facilidade de separação entre o biocatalisador e o produto final, diminuindo ou anulando os riscos de contaminação do produto com resíduos enzimáticos; permitir a realização de operações contínuas; possibilitar uma possível melhora na atividade, na seletividade e na especificidade enzimática; diminuir inibições provocadas por produtos e por componentes do meio reacional (FREIRE, 1988).

Os métodos de imobilização são divididos comumente em três tipos: ligação a suportes, encapsulamento e reticulação enzimática (MATEO *et al.*, 2007; HANEFELD *et al.*, 2009; SHELDON e van PELT, 2013). Cada um desses métodos será descrito a seguir.

#### Ligação a suportes

Esse método de imobilização enzimática envolve a ligação da enzima a suportes sólidos (orgânicos ou inorgânicos) insolúveis em meio aquoso (NELSON e GRIFFIN, 1916; CASTRO *et al.*, 2008). A interação entre a enzima e o suporte pode ocorrer por adsorção física, por meio de interações iônicas ou ligações covalentes.

A imobilização por adsorção física envolve forças de atração relativamente fracas, do tipo interação de *Van der Waals* e interações hidrofóbicas (KLIBANOV, 1979; SHELDON e van PELT, 2013). Esse é o método mais antigo e também o mais simples. As vantagens da imobilização por adsorção física são a facilidade para realização do procedimento, a não obrigatoriedade de pré-tratamentos ou modificações químicas no suporte, a pequena modificação conformacional que a enzima está sujeita durante o processo de imobilização e a possibilidade de regeneração do suporte (HANEFELD *et al.*, 2009). Contudo, como essas interações são fracas, a dessorção da enzima é facilitada, resultando em possível queda na atividade do biocatalisador durante a operação e também ao longo dos ciclos de uso, além da provável contaminação do produto por resíduos enzimáticos.

Como mencionado, a interação entre a enzima e o suporte também pode ocorrer por meio de interações iônicas (resinas de troca iônica são geralmente empregadas) ou



ligações covalentes (não reversíveis); ambas as interações são mais intensas que a adsorção física. No entanto, modificações podem ocorrer na conformação das enzimas suportadas, podendo inclusive ocorrer a diminuição da atividade enzimática. Vale ressaltar que a formação de múltiplas ligações covalentes entre a enzima e o suporte pode garantir a manutenção da conformação da enzima, evitando a sua desativação, caso a estrutura tridimensional da enzima seja mantida durante o processo de imobilização. No entanto, este tipo de interação não garante que todas as moléculas de enzima sejam imobilizadas da mesma forma em uma mesma batelada e pode provocar a rigidificação da enzima, resultando mais uma vez em diminuição de atividade. Além disso, o meio no qual a enzima livre se encontra precisa ser avaliado previamente, uma vez que muitos aditivos se encontram dispersos em muitas dessas soluções, podendo interferir na interação entre a enzima e o suporte. Ademais, caso a enzima seja ligada covalentemente (ou irreversivelmente) ao suporte na sua forma inativa, não há possibilidade de recuperar a enzima nem tampouco o suporte após a imobilização (MATEO *et al.*, 2007; HANEFELD *et al.*, 2009).

Dessa forma, a ausência de um método único mais adequado para imobilizar enzimas incentiva o desenvolvimento e o emprego de diversos materiais para uso no processo de imobilização enzimática, incluindo materiais poliméricos (naturais ou sintéticos) e sólidos inorgânicos, como sílica e zeólitas (CASTRO *et al.*, 2008; SHELDON e van PELT, 2013).

### Encapsulamento

O encapsulamento enzimático é um método que engloba as imobilizações de enzimas em matrizes semipermeáveis, mantendo-as aprisionadas nesses suportes e possibilitando a difusão apenas de substratos e produtos. Dessa forma, alguns procedimentos podem ser incluídos nesta categoria: a inclusão de enzimas nos interstícios de redes poliméricas, por meio do emprego de géis poliméricos; o aprisionamento de enzimas no interior de membranas do tipo fibra oca; o encapsulamento dessas proteínas em microcápsulas (KLIBANOV, 1979; CASTRO *et al.*, 2008; SHELDON e van PELT, 2013). Essa técnica é mais utilizada quando células são empregadas, e não apenas enzimas livres (SHELDON e van PELT, 2013).

### Reticulação

O método de imobilização por reticulação começou a ser estudado no início dos anos 1960. A reticulação de agregados ou cristais enzimáticos, por meio do emprego de reagentes bi- ou multi-funcionais (como glutaraldeído), é usada para gerar partículas insolúveis em meio aquoso, dispensando o emprego de suportes. Vale observar que a ausência de um suporte aumenta a porção catalítica disponível dos biocatalisadores, uma vez que todo o sistema (biomolécula) passa a ser formado apenas pelo próprio componente catalítico, a enzima. Assim, diversos estudos estão sendo realizados nessa área, conhecida por CLECs (*cross-linked enzymes crystals*) e CLEAs (*cross-linked enzyme aggregates*). Esse método apresenta algumas vantagens: alta concentração de enzima ativa no catalisador; elevada estabilidade; possível diminuição dos custos, em função da ausência de custos adicionais com preparação dos suportes e posterior imobilização (SHELDON e van PELT, 2013). Em contrapartida, essa técnica envolve elevadas quantidades de enzima, apresenta baixa retenção de atividade, baixa estabilidade mecânica e muitas vezes provoca a desativação da enzima, em função do recobrimento do sítio ativo por algumas ligações cruzadas que podem ser formadas (CASTRO *et al.*, 2008; SHELDON e van PELT, 2013)

Ao longo de um processo de imobilização, diferentes parâmetros devem ser avaliados, tais como: rendimento de imobilização; retenção de atividade; quantidade de proteína retida no suporte (SHELDON e van PELT, 2013). Todos esses parâmetros podem ser afetados pelo método de imobilização enzimática selecionado e o suporte utilizado. É importante destacar que não há um método mais indicado para a síntese de um biocatalisador. Como será detalhada ao longo desta seção, a síntese de um biocatalisador eficiente depende da enzima que será empregada, das propriedades do suporte utilizado, do método de imobilização escolhido e das características do meio reacional em que será utilizado (CAO, 2005). Tipicamente, o desenvolvimento de um biocatalisador promissor é realizado por meio de procedimentos de tentativa e erro. No entanto, atualmente, muitos estudos estão sendo realizados com o objetivo de acoplar dados experimentais a métodos computacionais e a conhecimentos da biologia molecular, de forma a melhor compreender a estrutura tridimensional da enzima no processo de imobilização e a descrever o desempenho dos biocatalisadores na forma de modelos matemáticos (HANEFELD *et al.*, 2009; PINTO *et al.*, 2013; WEISER *et al.*, 2015; JUNG *et al.*, 2016).

Vale ressaltar que os avanços alcançados nas áreas da microbiologia, engenharia genética e bioquímica têm possibilitado a produção de enzimas a preços mais atraentes comercialmente e a manipulação de suas propriedades, resultando em proteínas mais ativas, estáveis e seletivas (SHELDON e van PELT, 2013). Além disso, é importante destacar que a cada ano novas técnicas de imobilização, muitas oriundas da combinação dos métodos apresentados anteriormente, e novos suportes surgem, de forma a tornar a enzima imobilizada mais ativa e estável (KLIBANOV, 1979; CAO, 2009).

Com base no que foi apresentado, é evidente a importância do procedimento de imobilização para a implantação de processos enzimáticos em escala comercial, uma vez que possibilitam o aumento do desempenho enzimático e a reutilização desses biocatalisadores (SHELDON e van PELT, 2013). Assim, o presente estudo envolveu a síntese de diferentes partículas poliméricas para posterior uso como suporte na síntese de biocatalisadores. Optou-se por realizar neste trabalho o método de imobilização de enzimas em suportes poliméricos (adsorção física aos suportes). Dessa forma, as próximas seções serão relacionadas a este tipo de técnica, destacando-se as possíveis interações existentes entre as enzimas e os suportes.

### ***3.1.2. Efeitos da Imobilização no Desempenho das Enzimas***

O processo de imobilização pode provocar mudanças nas propriedades físicas e químicas das enzimas. Após a imobilização, a enzima fica exposta a um novo ambiente (microambiente), o que pode provocar alterações ainda mais significativas no seu desempenho. Dessa forma, alguns dos efeitos causados pelo processo de imobilização serão apresentados a seguir (FREIRE, 1988).

#### Efeitos conformacionais

Ao longo do processo de imobilização, a interação da enzima com a superfície do suporte pode resultar em modificações na estrutura tridimensional dessas proteínas. Essas alterações conformacionais podem provocar maior ou menor exposição do sítio ativo da enzima e, conseqüentemente, aumento ou redução da atividade enzimática, respectivamente (FREIRE, 1988). Uma mesma enzima, por exemplo, imobilizada em suportes com composições químicas distintas, pode apresentar atividades diferentes e

seletividades distintas, em função de possíveis efeitos conformacionais (PALOMO *et al.*, 2002).

#### Efeito de partição

Diversas interações podem ocorrer entre os suportes utilizados no processo de imobilização e os substratos e produtos envolvidos na reação enzimática. É sabido que suportes mais hidrofílicos apresentam interações mais intensas por substratos e produtos com o mesmo caráter. O mesmo tipo de afinidade existe entre materiais hidrofóbicos ou materiais que apresentem interações eletrostáticas. Dessa forma, gradientes de concentração podem surgir entre a superfície (ou a região interna) dos suportes e o seio da fase do meio reacional, alterando o microambiente enzimático e a atividade da enzima (quando comparada com sua forma solúvel). Em função desse efeito, podem ocorrer, por exemplo, inibições por produto, caso este apresente interação elevada com o suporte utilizado, ou aumentos expressivos na atividade enzimática, em função de uma possível elevada interação entre as moléculas de substrato e a superfície do suporte (FREIRE, 1988; TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO *et al.*, 2008);

#### Efeitos difusionais

O mecanismo de transferência de massa de substratos e produtos pode ser alterado a partir do processo de imobilização. Efeitos ou limitações difusionais desses componentes em sistemas homogêneos são praticamente desprezíveis. Contudo, após o processo de imobilização esse mecanismo é alterado: o substrato precisa migrar do seio do fluido até a superfície do catalisador (difusão externa); em seguida, o substrato deve difundir da superfície do suporte até o sítio ativo da enzima (difusão interna); após a reação, por meio da qual o substrato é convertido a produto, o produto deve migrar do centro ativo da enzima até a superfície do suporte (difusão interna); por fim, o produto deve difundir da superfície do suporte até o seio do fluido (difusão externa). Dessa forma, caso o diâmetro de poro seja muito pequeno ou a velocidade de agitação seja muito lenta, o fluxo de substratos e produtos pode ser afetado, diminuindo a acessibilidade da enzima a substratos ou ocorrendo acúmulo de produto nas proximidades do sítio ativo, resultando em queda de atividade enzimática (FREIRE, 1988; CASTRO *et al.*, 2008). Assim, um biocatalisador eficiente requer que substratos e produtos difundam livremente através do suporte (HANEFELD *et al.*, 2009).

### ***3.1.3. Efeitos da Imobilização na Estabilidade das Enzimas***

O processo de imobilização enzimática pode provocar o aumento ou a diminuição na estabilidade das enzimas. No entanto, em muitos estudos o mecanismo de inativação enzimática é empírico e a estabilização das enzimas carece de comprovação científica. Além disso, muitos resultados negativos não são divulgados. Por isso, criou-se a ideia de que a imobilização enzimática sempre provoca o aumento da estabilidade. Contudo, esse conceito não é válido sempre (HANEFELD *et al.*, 2009).

A estabilidade da enzima imobilizada depende de inúmeros fatores: tipos de interação existentes entre as enzimas e o suporte; grau de confinamento da enzima no suporte; condições de imobilização; microambiente a que a enzima está submetida após a imobilização; natureza intrínseca da enzima; tipo de reator utilizado no processo; propriedades do suporte empregado na imobilização (FREIRE, 1988). O emprego de suportes porosos, por exemplo, pode conferir maior estabilidade operacional à enzima imobilizada, uma vez que a interação da enzima com componentes do seio do fluido é diminuída. Além disso, dificulta a formação de agregados enzimáticos e também inativações causadas por solventes, em função dos possíveis mecanismos de partição mencionados anteriormente. Assim, apesar da estrutura da enzima não ser alterada, uma maior estabilidade enzimática pode ser atingida (MATEO *et al.*, 2007).

É importante destacar que a reutilização dos biocatalisadores (enzimas imobilizadas) constitui um dos pilares para a implantação de processos comercialmente viáveis. Nesse contexto, as enzimas imobilizadas devem apresentar estabilidade elevada o suficiente para possibilitar tal reutilização (MATEO *et al.*, 2007).

Vale salientar que o termo “estabilidade enzimática” engloba dois conceitos distintos: a estabilidade operacional e a estabilidade ao armazenamento. A estabilidade operacional está relacionada à capacidade que a enzima apresenta em manter sua atividade durante a operação do sistema reacional; ou seja, está associada ao tempo de meia-vida da enzima imobilizada nas condições de operação, e ao número de ciclos em que pode ser empregada sem perda expressiva de atividade. Em contrapartida, a estabilidade ao armazenamento está associada à capacidade da enzima em manter sua atividade no período entre a imobilização e a utilização (LEMOS *et al.*, 2000; CASTRO *et al.*, 2008). CUNHA (2011) avaliou a estabilidade à estocagem da lipase CAL-B imobilizada em diferentes suportes poliméricos, incluindo suportes casca-núcleo de um

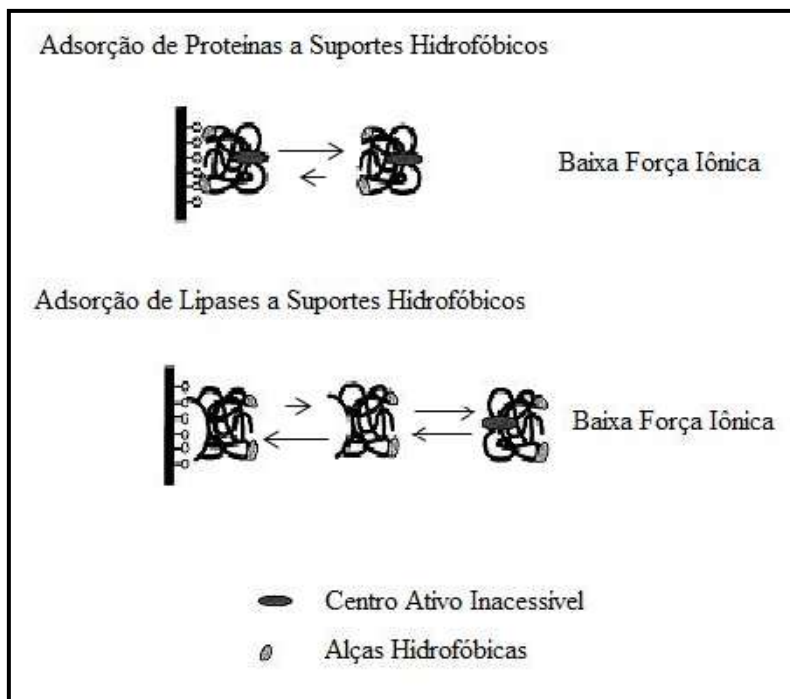
copolímero de estireno e divinilbenzeno (sintetizados também no presente estudo) e observou que tal material apresentava-se estável durante o período avaliado de armazenamento de dois meses.

### **3.1.4. Lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B)**

Uma etapa anterior à análise sobre os possíveis efeitos provocados no desempenho enzimático pelo processo de imobilização envolve o estudo mais detalhado sobre a enzima a ser empregada. Dentre as diversas enzimas existentes, optou-se por estudar o grupo das lipases. Essas enzimas são capazes de catalisar diversas reações, como as reações de hidrólise, esterificação, transesterificação, alcoólise. As lipases, por apresentarem ainda elevada atividade e seletividade, são aplicadas em diferentes setores, como o alimentício, têxtil, farmacêutico e de tratamento de efluentes (FORESTI *et al.*, 2007; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Ao analisar a estrutura tridimensional das lipases, é possível perceber a existência de duas conformações distintas. Há uma conformação conhecida como “fechada”, na qual o sítio ativo da enzima é isolado do meio reacional por uma espécie de tampa (estrutura anfipática móvel), correspondendo, portanto, à estrutura inativa da lipase. Outra conformação corresponde à forma ativa (chamada de “aberta”) é caracterizada pela abertura dessa tampa e à exposição do sítio ativo da enzima para o meio reacional. As duas estruturas coexistem em equilíbrio, podendo ser afetadas pelas condições reacionais. É possível observar a exposição do sítio ativo da lipase quando a enzima é colocada em contato com suportes hidrofóbicos, por exemplo. Isso ocorre porque alguns elementos da estrutura secundária dessas enzimas e que cobrem o sítio ativo das mesmas, ao entrar em contato com superfícies hidrofóbicas mudam sua conformação, havendo a exposição do sítio ativo das lipases. Essa mudança conformacional não é observada quando outras proteínas são empregadas. Dessa forma, na presença de substratos hidrofóbicos ou suportes hidrofóbicos (meios aquo-restritos), por exemplo, há tendência de mudança conformacional das lipases para sua forma aberta, havendo o aumento da atividade enzimática. Estudos mostram também que a adsorção de lipases a suportes hidrofóbicos sob condições de baixa força iônica (tais como solução fosfato de sódio entre 5 – 100 mM), além de favorecer a imobilização na forma aberta, possibilita a adsorção preferencial de lipases frente às demais proteínas presentes no extrato proteico (condição

empregada no procedimento de imobilização do presente trabalho) (BASTIDA *et al.*, 1998; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; MATEO *et al.*, 2007). Esse mecanismo de adsorção é mostrado na Figura 51.



**Figura 51.** Mecanismo de adsorção de lipases a suportes hidrofóbicos (*Adaptado de FERNANDEZ-LAFUENTE et al., 1998*).

A lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) é uma das lipases mais utilizadas em biocatálise, em função das elevadas estabilidade, atividade e especificidade. Pode ser empregada em reações de hidrólise e em diferentes reações de síntese orgânica, como na produção de derivados de *mio*-inositol para a indústria de fármacos, biodiesel no setor de biocombustíveis, ésteres para a indústria de cosméticos e até biolubrificantes. É comercializada nas formas solúvel e imobilizada por diferentes fornecedores, dentre elas a *Novozym® 435* (CAL-B imobilizada em suportes macroporosos de ésteres butil- e metil- metacrílicos reticulados com divinilbenzeno), comercializada pela empresa Novozymes. Essa enzima apresenta massa molar de 33 kDa e ponto isoelétrico igual a 6,0 (UPPENBERG *et al.*, 1994; ANDERSON *et al.*, 1998; PALOMO *et al.*, 2002; HANEFELD *et al.*, 2009). Como a princípio o suporte não apresenta cargas na superfície, espera-se que apenas interações hidrofóbicas estejam envolvidas na interação entre a enzima empregada e os suportes sintetizados.

É importante mencionar que ainda hoje não há um consenso em relação à estrutura tridimensional da CAL-B: alguns estudos mencionam que a enzima apresenta uma pequena tampa na entrada do sítio ativo; outros trabalhos descrevem que um canal tortuoso precede o centro ativo (UPPENBERG *et al.*, 1995; LUTZ, 2004; HANEFELD *et al.*, 2009). Apesar da falta de consenso quanto à estrutura da lipase, o mecanismo de ativação interfacial da CAL-B é descrito em inúmeros estudos da literatura (FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; PALOMO *et al.*, 2002; MATEO *et al.*, 2007).

### ***3.1.5. Interação entre Enzimas e Suportes no Processo de Imobilização***

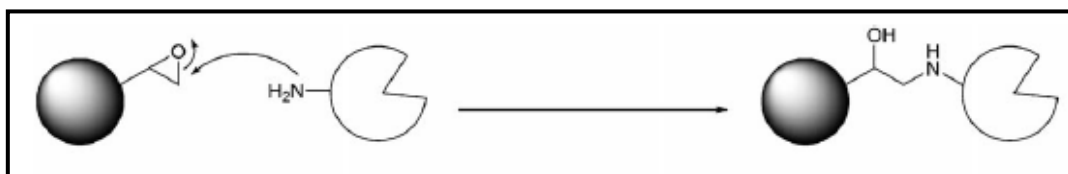
No processo de imobilização, a interação existente entre a enzima de interesse e o suporte selecionado é de extrema importância, resultando em um biocatalisador (uma enzima imobilizada) com propriedades de natureza química, mecânica, bioquímica e cinética específicas (TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO *et al.*, 2008; SHELDON e van PELT, 2013). Nesse contexto, o desempenho final do biocatalisador produzido é função de uma série de fatores, que incluem desde as características da enzima a ser empregada no meio reacional, o método de imobilização utilizado, até as propriedades físico-químicas do suporte, a própria configuração do reator em que o biocatalisador será utilizado (por exemplo, reator em leito fixo ou leito fluidizado) e os fenômenos de transferência massa envolvidos durante a operação do sistema reacional (KLIBANOV, 1979; TISCHER e KASCHE, 1999).

Ao considerar especificamente as propriedades enzimáticas, alguns parâmetros precisam ser destacados: o volume e a massa molar da enzima; flexibilidade conformacional requerida durante a reação de catálise; ponto isoelétrico da enzima; grupamentos funcionais presentes na superfície; estabilidade nas condições de imobilização; presença de regiões hidrofóbicas e hidrofílicas; necessidade de aditivos na etapa de preparação da solução enzimática; concentração de enzima utilizada (BALCÃO *et al.*, 1996). Vale ressaltar que alguns estudos mostraram o aumento da atividade de lipases após a imobilização, principalmente quando suportes hidrofóbicos foram empregados, muito provavelmente em função da maior exposição do sítio ativo da enzima, mecanismo detalhado na seção anterior (BALCÃO *et al.*, 1996; FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.*, 1998; MATEO *et al.*, 2007).



Especificamente em relação aos suportes utilizados, algumas características também devem ser avaliadas: tipo do suporte empregado (orgânico ou inorgânico); área específica; porosidade; tamanho de partícula; a possibilidade de haver interações não específicas entre o substrato e o suporte; estabilidade química e mecânica; custo de produção; insolubilidade no meio reacional; resistência a contaminações microbianas; estabilidade térmica; diâmetro médio de poros adequado para permitir o acesso de enzimas e de substratos à área interna do suporte (no caso do emprego de suportes porosos); a depender da enzima, a natureza hidrofóbica (ao considerar a imobilização de lipases, por exemplo) ou hidrofílica (alguns suportes hidrofóbicos provocam a diminuição da estabilidade e da atividade de algumas enzimas imobilizadas) (CASTRO *et al.*, 2008).

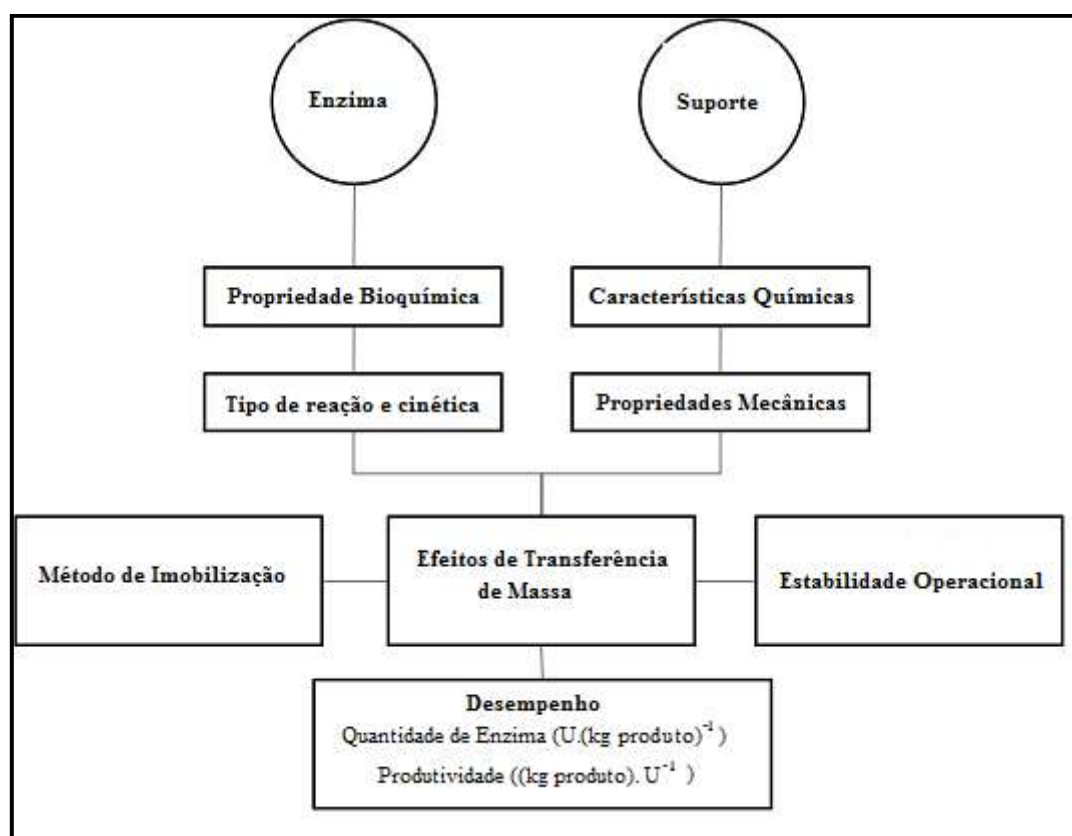
Além disso, muitas vezes pode ser conveniente que os suportes apresentem grupamentos funcionais na superfície, aumentando a interação com determinadas enzimas e permitindo, em alguns casos, a realização da imobilização por ligação covalente (HANEFELD *et al.*, 2009). Ao considerar especificamente as interações de caráter covalente, além de todas as características expostas anteriormente, o suporte deve apresentar também elevada densidade superficial de grupamentos reativos, favorecendo a interação com as enzimas e resultando em ligações (enzima-suporte) estáveis por longos períodos. Dentre os diferentes grupamentos reativos, os grupamentos funcionais do tipo epóxido e glioxila são mais comumente empregados (MATEO *et al.*, 2007; HANEFELD *et al.*, 2009). Apenas para ilustrar esse tipo de interação por ligação covalente, é mostrada a Figura 52. É importante mencionar que muitas enzimas ativas requerem adequada flexibilidade conformacional durante o processo catalítico. Assim, espaçadores podem ser usados entre a enzima e o suporte, objetivando aumentar a mobilidade enzimática e, conseqüentemente, sua atividade (CAO, 2005).



**Figura 52.** Mecanismo de imobilização enzimática por ligação covalente (*Adaptado de HANEFELD et al., 2009*).

Além do que foi apresentado, as propriedades do meio reacional também precisam ser consideradas, como a composição, viscosidade, pH, natureza do solvente, força iônica

do meio. Além disso, ainda precisam ser avaliados o tipo de interação proteína-suporte existente no processo de imobilização, o tempo de imobilização, a temperatura do meio reacional, a velocidade de agitação do meio, a probabilidade de ocorrer uma possível inibição enzimática e precipitação de produtos, e a existência de possíveis limitações difusionais. Vale salientar que a condição ideal de cada um desses parâmetros depende de cada processo de imobilização especificamente (TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO *et al.*, 2008; HANEFELD *et al.*, 2009). A Figura 53 sintetiza os inúmeros fatores envolvidos no processo de imobilização e apontados ao longo desta seção como responsáveis pelo desempenho do biocatalisador: as propriedades intrínsecas da enzima e do suporte, a interação existente entre a enzima e o suporte, o método de imobilização e a forma de operação do sistema no qual o biocatalisador será utilizado (CASTRO *et al.*, 2008).



**Figura 53.** Fatores que afetam o desempenho do biocatalisador (*Adaptado de TISCHER e KASCHE, 1999; CASTRO et al., 2008*).

Diferentes materiais podem ser empregados como suporte para a imobilização enzimática, incluindo materiais inorgânicos, como sílica, zeólitas, alumina e

hidroxiapatita, pois são geralmente estáveis termicamente e mecanicamente, não são tóxicos e são resistentes à presença de solventes orgânicos e a ataques microbianos. Polímeros naturais, como quitina, agarose, quitosana, gelatina, dextrana e celulose, e polímeros sintéticos, como poliacrilamida, poli(álcool vinílico), poliestireno, dentre outros, também podem ser utilizados. Os suportes poliméricos apresentam algumas desvantagens, como menor estabilidade térmica; restrições a determinadas faixas de pH; baixa estabilidade na presença de solventes; e baixa resistência a contaminações microbianas. Contudo, ainda assim os polímeros orgânicos são os materiais mais largamente empregados nos processos de imobilização (KAHRAMAN *et al.*, 2007; RESHMI *et al.*, 2007; HANEFELD *et al.*, 2009).

Dessa forma, inúmeros avanços estão sendo realizados para o desenvolvimento de novos polímeros sintéticos, uma vez que são em geral de fácil preparação e apresentam usualmente baixo custo de preparo. Além disso, algumas de suas características podem ser manipuladas, de forma a viabilizar a melhor interação entre a enzima e o suporte, como composição, porosidade, tamanho de partícula e funcionalidade na superfície desses materiais, possibilitando o estabelecimento e o controle de interações específicas entre enzima e suporte (KAHRAMAN *et al.*, 2007; BESTETI, 2009).

Por tudo que foi apresentado, é possível notar que não há um procedimento adequado único de imobilização válido para todas as enzimas. A depender do suporte utilizado no processo de imobilização, o biocatalisador pode apresentar uma atividade específica. Assim, almeja-se desenvolver para cada tipo de enzima estudada e para cada meio reacional, um suporte específico e com as características mais apropriadas para resultar em um biocatalisador com o melhor desempenho. Esta área, conhecida genericamente como Engenharia de Suportes, é pouco desenvolvida no Brasil, o que reforça a importância do estudo realizado.

### ***3.1.6. Suportes Poliméricos Empregados na Imobilização Enzimática***

Como pode ser percebido ao longo deste capítulo, diversos estudos estão sendo realizados com o objetivo de imobilizar diferentes enzimas em suportes com características específicas, visando a determinadas aplicações. Na literatura científica são encontrados trabalhos que descrevem o processo de imobilização em materiais orgânicos, inorgânicos e em materiais inorgânicos recobertos com componentes poliméricos,

buscando obter biocatalisadores mais ativos e estáveis (KAHRAMAN *et al.* 2007; RESHMI *et al.* 2007).

Nos últimos anos tem emergido uma área conhecida por nanobiocatálise, que envolve a interação de materiais em escala nanométrica e da biotecnologia, englobando também processos de imobilização enzimática em nanomateriais. Tem sido explorada a utilização de nanofibras, nanocarreadores mesoporosos e nanocápsulas para esse fim. Os nanobiocatalisadores vêm sendo aplicados em diferentes reações catalíticas, apresentando desempenhos promissores em processos distintos (MISSON *et al.*, 2015; CIPOLATTI *et al.*, 2016). Nesse contexto, também é grande o destaque que vem sendo dado aos suportes formados por nanopartículas magnéticas (geralmente, nanopartículas de sílica contendo núcleo de óxido de ferro e grupamentos funcionais na superfície). Esses materiais destacam-se por apresentar elevada área específica, serem não porosos (o que facilita os mecanismos de transferência de massa, reduzindo possíveis efeitos de limitação difusional, geralmente presentes em materiais porosos) e são de fácil separação, apesar de serem obtidos em escala nanométrica (SHELDON e van PELT, 2013; CIPOLATTI *et al.*, 2016; MEHRASBI *et al.*, 2017). No entanto, uma grande desvantagem desses processos é a alta exposição enzimática ao meio reacional, impossibilitando a formação de microambientes, muitas vezes benéficos, nas proximidades da enzima imobilizada (MATEO *et al.*, 2007).

Ao analisar a literatura científica que aborda especificamente imobilizações de lipases a suportes poliméricos, percebe-se que um número expressivo de estudos é realizado nessa área (CUNHA *et al.* 2008; CUNHA *et al.*, 2009; SAY *et al.*, 2011; TAI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2013). Dessa forma, objetivando direcionar um pouco mais a discussão para a enzima utilizada no presente trabalho, o foco principal desta seção será dado aos estudos que empregam suportes poliméricos no processo de imobilização da enzima utilizada no presente estudo, lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). A seguir serão apresentados alguns dos trabalhos encontrados sobre esse assunto na literatura.

ARROYO *et al.* (1998) estudaram a imobilização da CAL-B em diferentes suportes por ligação covalente, avaliando a estabilidade de tais biocatalisadores. Para isso, foram empregadas resinas de Sepharose (suporte à base de agarose, um polissacarídeo) ativadas com grupamentos do tipo epóxido. Os resultados encontrados foram comparados aos obtidos quando suportes à base de alumina e sílica foram empregados. Pôde-se observar o aumento pronunciado na estabilidade dos biocatalisadores produzidos, quando

ligações covalentes entre enzima-suporte eram estabelecidas, tendo sido observadas inclusive mudanças no mecanismo de desativação.

Outro estudo realizado buscou avaliar a adsorção de lipases, incluindo a CAL-B, em diferentes suportes poliméricos, como o suporte octadecil-Sepabeads (suporte à base de polimetacrilato, funcionalizado com grupamentos octadecila), glutaraldeído-agarose (suporte à base de um polissacarídeo, funcionalizado com grupamento glutaraldeído) e glioxil-agarose (suporte à base de um polissacarídeo, funcionalizado com grupamento glioxila). Diferentes metodologias de imobilização foram conduzidas, sendo determinados os desempenhos dos diferentes biocatalisadores produzidos. Os resultados mais promissores quanto à atividade da enzima imobilizada e à estabilidade (térmica e à presença de solventes) foram obtidos a partir da adsorção física das lipases ao suporte hidrofóbico octadecil-Sepabeads, muito provavelmente em função da estrutura aberta da lipase ser mais ativa e estável (PALOMO *et al.*, 2002)

TORRES *et al.* (2006) estudaram a síntese de diferentes biocatalisadores, empregando a lipase B de *Candida antarctica* como enzima de interesse e um suporte de agarose recoberto com polietilenoimina. Percebeu-se que tais biocatalisadores exibiam diferentes atividades e seletividades, a depender da condição de imobilização empregada, em função de possíveis mudanças conformacionais na estrutura da enzima provocadas pelas diferentes metodologias de imobilização.

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

Outro trabalho foi realizado buscando avaliar os efeitos do diâmetro médio de partículas e diâmetro médio de poro no processo de imobilização da enzima CAL-B. Partículas poliméricas porosas de poliestireno foram empregadas. Dessa forma, observou-se que a enzima selecionada apresentava enorme afinidade pelo suporte polimérico, sendo adsorvida com pronunciada rapidez. Notou-se que a fração de enzima ativa na forma imobilizada não dependia do tamanho das partículas poliméricas nem do diâmetro de poros, ao menos para a faixa estudada. Foi possível perceber também que

havia um aumento na velocidade da catálise com o aumento do diâmetro de poros do suporte, considerando uma mesma quantidade de enzima adsorvida (CHEN *et al.*, 2007b).

CHEN *et al.* (2008) estudaram a imobilização por ligação covalente da enzima CAL-B em micropartículas porosas comerciais de poli(metacrilato de metila) ativadas com grupamentos do tipo epóxido na superfície. Para efeito comparativo, foram empregadas nanopartículas não porosas com núcleo de polidivinilbenzeno e casca de poli(metacrilato de glicidila). O biocatalisador sintetizado a partir das nanopartículas apresentou maiores atividades. Além disso, foi possível observar que as enzimas imobilizadas por ligação covalente, em relação às imobilizadas por adsorção física, puderam ser reutilizadas com menor perda de atividade em um número maior de ciclos.

TORRES *et al.* (2008) empregaram biocatalisadores distintos em reações de acetilação da vitamina E. Tais biocatalisadores foram obtidos por meio da imobilização da lipase B de *Candida antarctica*, CAL-B, em diferentes suportes: suporte à base de polímero biodegradável, *Purasorb* (poli(ácido lático-co-glicólico)); uma resina de troca iônica, Lewatit (copolímero de metacrilato de metila e divinilbenzeno, contendo grupamentos funcionais na superfície); Accurel EP 100 (polipropileno). As taxas de reação mais elevadas foram obtidas quando o Accurel foi empregado como suporte, provavelmente em função da maior porosidade.

Em outro estudo foi realizada a imobilização da CAL-B em um suporte polimérico macroporoso de poli(metacrilato de glicidila-co-dimetacrilato de etilenoglicol), sendo avaliados os efeitos do diâmetro médio de poro e do tamanho das partículas poliméricas no processo de adsorção da lipase e nas atividades de hidrólise (hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila) e de síntese (reação de polimerização por abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona) da enzima imobilizada. Os suportes foram produzidos a partir de uma reação de polimerização em suspensão. Foi possível observar que, sob condições de imobilização específicas, a maior parte das enzimas se ligou covalentemente ao suporte. Observou-se também que, na condição ótima de imobilização, a diminuição do tamanho de partículas provocava a diminuição na quantidade de proteína adsorvida e aumento nas atividades de hidrólise e de síntese. Notou-se ainda que o aumento do diâmetro de poro e da área específica das partículas resultava em maiores atividades de hidrólise e de síntese do biocatalisador (MILETIĆ *et al.*, 2009).

MILETIĆ *et al.* (2010) estudaram a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* em nanopartículas de poliestireno, sintetizadas a partir de um processo de

nanoprecipitação. Foi avaliada a influência do pH da solução tampão, utilizada no processo de imobilização, tanto no rendimento de imobilização quanto na atividade da enzima imobilizada. Pôde-se perceber que a quantidade total de enzima adsorvida era independente do pH do processo de adsorção. Foi possível observar também que, em função da conformação enzimática durante a imobilização, a maior atividade de hidrólise do biocatalisador era obtida quando o processo de imobilização era realizado em condições próximas ao ponto isoelétrico da enzima (6,8).

A CAL-B também foi empregada em reações de transesterificação de triglicerídeos em sistemas contínuos, estudo este realizado por SÉVERAC *et al.* (2011). O desempenho da enzima comercial *Novozym 435* foi comparado ao da enzima CAL-B imobilizada no suporte comercial Accurel. As maiores atividades catalíticas foram encontradas quando o suporte Accurel foi utilizado, em função de seu caráter mais hidrofóbico, o que reduzia possíveis inibições por produto causadas por uma adsorção mais intensa de glicerol aos suportes mais hidrofílicos.

HERNANDEZ *et al.* (2011) empregaram partículas comerciais porosas à base de poli(estireno-co-divinilbenzeno) para a imobilização da lipase CAL-B. Os suportes avaliados apresentaram elevada capacidade de adsorção de proteína e as atividades das enzimas imobilizadas também foram expressivas. Dessa forma, os suportes analisados, além de mais baratos, se mostraram bastante promissores quando comparados a outros suportes recomendados para a imobilização enzimática.

BARBOSA *et al.* (2012) imobilizaram a lipase CAL-B em suportes de agarose (suporte à base de polissacarídeos) funcionalizados com grupamentos do tipo aldeído e amina na superfície. A partir do tratamento prévio de alguns suportes com glutaraldeído, foi possível perceber que, a depender das condições de imobilização (força iônica do meio e presença de surfactantes), tal componente conferia às partículas a possibilidade de interagir sob diferentes formas com a enzima empregada por adsorção física, ligação covalente e ligação iônica. Para cada um dos biocatalisadores produzidos, foram observadas atividades enzimáticas diferentes e enantiosseletividades distintas.

A lipase B de *Candida antarctica* também foi adsorvida em uma nova resina acrílica, ECR 1030 (um copolímero de divinilbenzeno e metacrilato). Este suporte mostrou-se ser mais estável mecanicamente que outros polímeros empregados para imobilização desta lipase, inclusive em relação à resina utilizada para síntese do biocatalisador *Novozym 435*. Foi possível observar também, para a enzima imobilizada

produzida, um elevado rendimento de imobilização e uma atividade catalítica próxima da encontrada para o biocatalisador comercial. Diferentes materiais poliméricos foram produzidos até que a composição ótima fosse alcançada, resultando na resina ECR 1030. Contudo, a metodologia empregada para a síntese de tais suportes não foi mencionada (BASSO *et al.*, 2013).

POPPE *et al.* (2013a) avaliaram o desempenho da CAL-B imobilizada em suportes de poli(estireno-co-divinilbenzeno) em reações de transesterificação. Os resultados obtidos foram comparados aos encontrados para a enzima comercial *Novozym 435*. Ambos os biocatalisadores apresentaram elevada estabilidade, podendo ser reutilizados em oito ciclos; resultado que estimula o emprego de ambos em sistemas de larga escala. Reação similar foi estudada por POPPE *et al.* (2013b), mas com o emprego de biocatalisadores obtidos a partir da imobilização da enzima por ligação covalente ao suporte Immobead 150 (suporte polimérico à base de metacrilatos) funcionalizados com grupamentos do tipo aldeído na superfície. A eficiência catalítica associada à síntese dos ésteres metílicos de ácidos graxos foi elevada quando a enzima utilizada foi a CAL-B, estimulando a realização de estudos mais aprofundados para a otimização da reação de síntese de biodiesel.

ALVES *et al.* (2014) compararam o desempenho da CAL-B imobilizada em uma resina comercial à base de poli(estireno-co-divinilbenzeno) com o da enzima comercial *Novozym 435* para a síntese de acetato de butila. Percebeu-se que o emprego do ultrassom resultou em aumento da estabilidade e da atividade enzimática, em função da melhor homogeneidade do meio e das menores tensões mecânicas. Além disso, as taxas de reação obtidas para os biocatalisadores sintetizados foram mais pronunciadas que as observadas para enzima imobilizada comercial.

TACIAS-PASCACIO *et al.* (2016) empregaram diferentes biocatalisadores enzimáticos em reações de hidrólise de diferentes substratos. Foram utilizados diferentes suportes comerciais poliméricos: Lifetech™ ECR1061M (polímero à base de estireno e comonômero metacrílico); Lifetech™ ECR8804M (polímero à base de metacrilato de octadecila); Lifetech™ ECR8806M (polímero à base de metacrilato de octadecila); Lifetech™ ECR1090M (polímero à base de metacrilato de octadecila); Lifetech™ ECR1030M (polímero à base de divinilbenzeno e comonômero metacrílico). Quatro lipases distintas foram estudadas (RML – Lipase de *Rhizomucor miehei*; TL – Lipase de *Thermomyces lanuginosus*; CAL-A e CAL-B - formas A e B da lipase *Candida*



*antarctica*) e a fosfolipase (LU – Lecitase Ultra). Os desempenhos dos biocatalisadores produzidos foram comparados aos dos biocatalisadores comerciais (quando disponíveis: TL-IM, RM-IM e *Novozyme 435*). Notou-se que, para cada reação, havia um par enzima-suporte que resultava no biocatalisador mais ativo.

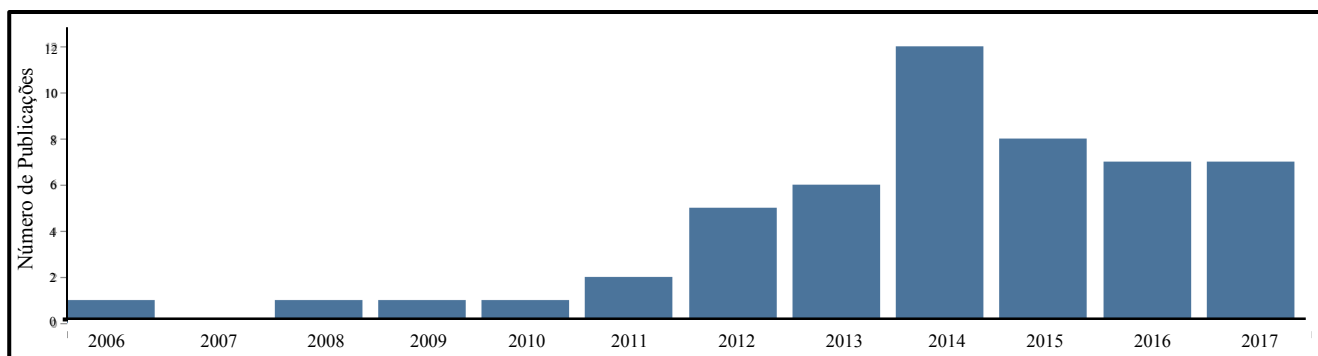
TACIAS-PASCACIO *et al.* (2017) realizaram um estudo semelhante ao apresentado anteriormente, empregando biocatalisadores enzimáticos similares em reações de síntese de biodiesel. Foi percebido que, a depender do meio reacional, os biocatalisadores apresentavam desempenhos distintos. Para um meio reacional sem solvente, por exemplo, o biocatalisador mais ativo foi sintetizado a partir da imobilização da TLL em suportes à base de estireno e metacrilato.

Partículas à base de resina metacrílica funcionalizadas com grupamentos octadecila também foram empregadas como suporte para imobilização da lipase CAL-B (BASSO *et al.*, 2016). Os biocatalisadores produzidos exibiram elevadas atividades. Foram sintetizados também biocatalisadores bastante ativos ao empregar as lipases de RM e TL. Assim, foi atribuído aos grupamentos funcionais octadecila o desempenho satisfatório dos biocatalisadores produzidos

Com base em todos os estudos descritos, é possível notar que, com exceção dos trabalhos realizados por CHEN *et al.* (2008) e MILETIĆ *et al.* (2009, 2010), a forma com que os suportes foram sintetizados não foi descrita. Os suportes empregados nos diferentes trabalhos foram obtidos comercialmente por compra ou por doação, não havendo qualquer detalhamento sobre o procedimento usado para a síntese dos mesmos.

### ***3.1.7. Suportes Poliméricos Sintetizados a partir do Processo de Polimerização em Suspensão-Emulsão Empregados na Imobilização Enzimática***

Ao analisar as pesquisas descritas na literatura em que partículas com morfologia casca-núcleo foram empregadas para a imobilização de lipases, percebe-se que um número reduzido de estudos publicados anualmente, como mostrado na Figura 54 (obtida por meio de site *Web of Knowledge*, empregando como palavras-chave *lipase*, *immobilization* e *core-shell*).



**Figura 54.** Trabalhos publicados na literatura científica, de acordo com a base de dados *Web of Knowledge* (2017), usando as palavras-chave *lipase*, *immobilization* e *core-shell*.

PINTO *et al.* (2004) foram os pioneiros a empregar as partículas com morfologia casca-núcleo sintetizadas por meio da polimerização em suspensão e emulsão simultâneas para a suportação de células e de compostos enzimáticos. É preciso destacar que a produção de suportes enzimáticos a partir da tecnologia desenvolvida por LENZI (2002) e LENZI *et al.* (2003) é vantajosa, pois possibilita a síntese de partículas porosas, em uma única etapa reacional, de dimensões micrométricas e funcionalizadas com componentes específicos na superfície, permitindo maior interação com a enzima, a depender das características intrínsecas de cada enzima a ser imobilizada. A partir destes estudos, inúmeros trabalhos foram desenvolvidos no Laboratório EngePol (Laboratório de Engenharia de Polimerização) em parceria com o Laboratório LABIM (Laboratório de Biotecnologia Microbiana), objetivando produzir biocatalisadores promissores e estimulando a área de Engenharia de Suportes no país.

Um estudo subsequente foi realizado por FIGUEIREDO *et al.* (2005), em que foi avaliada a aplicação de diferentes suportes (a hidroxiapatita; um copolímero de estireno e divinilbenzeno; partículas com morfologia casca-núcleo) para a imobilização da lisozima, objetivando efetuar a separação desta enzima de uma mistura proteica. Foi possível notar maior adsorção da proteína quando a hidroxiapatita foi utilizada. Contudo, os resultados obtidos com o emprego dos suportes casca-núcleo foram bastante satisfatórios, uma vez que adsorveram quantidades elevadas de enzima, além de apresentarem baixo custo de produção e serem facilmente funcionalizados.

O trabalho desenvolvido por BESTETI (2011) envolveu a produção de diferentes suportes com morfologia casca-núcleo a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, apresentando diferentes composições no núcleo e na casca. Os

monômeros empregados foram metacrilato de metila, estireno, acetato de vinila e divinilbenzeno. Em muitas reações foi adicionado o componente divinilbenzeno, que provoca a reticulação das cadeias poliméricas, resultando em partículas com áreas específicas mais pronunciadas e menores diâmetros de poro. Em seguida, BESTETI (2011) e CUNHA (2011) empregaram tais suportes para imobilização da lipase comercial CAL-B e avaliaram o desempenho dos biocatalisadores, determinando as atividades de hidrólise e esterificação. Foi possível observar que os biocatalisadores obtidos por meio da utilização de suportes com núcleo e casca de poli(estireno-co-divinilbenzeno) apresentaram valores de atividade de hidrólise e de esterificação próximos ao valor da enzima comercial, *Novozym*<sup>®</sup> 435, e superiores aos obtidos nas imobilizações realizadas no suporte comercial Accurel<sup>®</sup> MP1000.

BESTETI *et al.* (2014a) descreveram a imobilização da CAL-B em suportes com morfologia casca-núcleo à base de metacrilato de metila, estireno e cardanol, obtidos por meio da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Os biocatalisadores produzidos apresentaram desempenho mais satisfatório que a enzima imobilizada no suporte comercial, Accurel MP 1000. Além disso, os suportes que possuíam na casca um copolímero de estireno e cardanol foram os que apresentaram maiores atividades de hidrólise, muito provavelmente em função das longas cadeias hidrofóbicas oriundas do cardanol.

CUNHA *et al.* (2014) mostrou que, além das reações de hidrólise e de esterificação, os biocatalisadores produzidos por BESTETI (2011) poderiam ser empregados com êxito na resolução cinética de derivados de *mio*-inositol (reação de transesterificação). Foi observado também que, a depender da reação estudada, o desempenho dos biocatalisadores dependia da matriz polimérica empregada como suporte no processo de imobilização. Ao considerar as reações de hidrólise, por exemplo, o suporte com casca e núcleo de poli(metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) resultaram em biocatalisadores com atividades mais expressivas que os preparados com o suporte comercial Accurel MP 1000. Por outro lado, as maiores atividades de esterificação foram obtidas quando suportes com casca e núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) foram empregados. Com relação à resolução cinética de derivados de *mio*-inositol, os resultados de conversão total e de excesso enantiomérico foram semelhantes para os três suportes mencionados. Contudo, os suportes casca-núcleo originaram biocatalisadores com atividades iniciais mais pronunciadas.

PINTO (2013) e PINTO *et al.* (2014) avaliaram a influência da morfologia das partículas poliméricas casca-núcleo nos parâmetros de imobilização da lipase B de *Candida antarctica* e nas atividades de hidrólise (utilizando laurato de *p*-nitro fenila, como substrato) e de esterificação (usando ácido oleico e etanol, como substratos) dos biocatalisadores produzidos. Observou-se que para uma carga proteica inicial, havia uma área mínima necessária para que toda a enzima fosse adsorvida. Além disso, em função de limitações difusionais, o aumento da área específica dos suportes era acompanhado por uma queda na atividade hidrolítica dos biocatalisadores produzidos. No entanto, ao analisar a atividade de esterificação, pôde-se notar que o aumento da área específica era acompanhado pelo aumento da atividade catalítica, em função da maior quantidade de enzima retida ao suporte e da menor relevância das resistências difusionais neste tipo de reação. Modelos empíricos também foram desenvolvidos, descrevendo as atividades de hidrólise e de esterificação do biocatalisador em função das características morfológicas dos suportes: diâmetro médio de poro, volume específico de poros e área específica. Vale ressaltar que a presença de efeitos difusionais, conformacionais e estereoquímicos dificulta a modelagem desses sistemas.

CIRILO *et al.* (2014) produziram diferentes suportes casca-núcleo, empregando na composição da casca diferentes comonomeros de cadeia longa (benzoato de vinila, estireno, divinilbenzeno, cardanol, 1-octeno). Tais resinas também foram utilizadas para a imobilização da CAL-B. Foi possível perceber que, para as reações de hidrólise, aparentemente houve uma região de mínima atividade do biocatalisador, ao avaliar a influência do aumento do grau de hidrofobicidade dos suportes. No entanto, ao analisar as atividades de esterificação, o aumento do grau de hidrofobicidade dos polímeros era acompanhado pelo aumento da atividade do biocatalisador correspondente. Os comportamentos observados resultaram possivelmente de dois efeitos antagônicos que afetam o desempenho do biocatalisador: maior exposição do sítio ativo das enzimas (em suportes hidrofóbicos) ou menor exposição (em suportes hidrofílicos); presença mais significativa de limitações difusionais (em reações de hidrólise) ou menos expressiva (em reações de esterificação). Assim, percebeu-se que o desempenho dos biocatalisadores produzidos dependia não só da morfologia e da composição dos suportes empregados na imobilização da enzima, mas também da composição do próprio meio reacional onde seria empregado.

MANOEL (2011), MANOEL (2014) e MANOEL *et al.* (2016a) estudaram a síntese de biocatalisadores, empregando as partículas com morfologia casca-núcleo desenvolvidas por BETETI (2011) e a enzima comercial lipase B de *Candida antarctica*. Foi estudada também a imobilização da CAL-B expressa em *Pichia pastoris* (LIPB) (enzima desenvolvida no Laboratório de Biotecnologia Microbiana) nos suportes casca-núcleo. Tais biocatalisadores foram empregados na resolução cinética de diferentes derivados de *mio*-inositol. Dentre os suportes avaliados, os biocatalisadores produzidos a partir das partículas casca-núcleo de poli(estireno-co-divinilbenzeno) destacaram-se frente aos demais analisados, apresentando resultados promissores de conversão e excesso enantiomérico, sendo empregados em até 12 ciclos de reação sem perda significativa de atividade. Os biocatalisadores produzidos apresentaram resultados mais promissores que os encontrados para a *Novozym 435* (resultou em menor excesso enantiomérico e menor estabilidade em relação ao número de reciclos).

MANOEL *et al.* (2016b) empregaram diferentes suportes à base de estireno e divinilbenzeno (reações que foram descritas na **Seção 2.3.1**) para imobilização de três lipases distintas: CAL-B, RML e TLL. O desempenho dos biocatalisadores produzidos foram comparados aos correspondentes biocatalisadores comerciais (*Novozym 435* (CAL-B), *Lipozyme RM IM* e *Lipozyme TL IM*). Foi possível observar que os biocatalisadores sintetizados apresentaram atividades de hidrólise mais expressivas que os biocatalisadores comerciais, empregando diferentes substratos.

### **3.1.9. Comentários Finais**

Por tudo o que foi apresentado, é possível notar a enorme abrangência dos processos de imobilização enzimática, tanto em relação aos novos materiais desenvolvidos, visando à síntese de novos suportes, quanto em relação às inúmeras enzimas estudadas e às diferentes metodologias de imobilização. Contudo, são poucos os trabalhos realizados especificamente na área de Engenharia de Suportes, em que um determinado material é produzido para interagir da melhor forma com uma enzima específica, resultando em biocatalisadores com o máximo desempenho. Nesse contexto, com exceção dos trabalhos realizados no próprio laboratório, apenas três trabalhos sintetizaram partículas para a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CHEN *et al.*, 2008; MILETIĆ *et al.*, 2009; MILETIĆ *et al.*, 2010). São notórios também os avanços

realizados na síntese de partículas com morfologia casca-núcleo, a partir da técnica de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, objetivando empregá-las em processos de imobilização de enzimas.

Dessa forma, o presente trabalho visou à produção de biocatalisadores enzimáticos, avaliando sua aplicação em reações de hidrólise e reações de esterificação. A lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) comercial foi a enzima empregada ao longo do trabalho, uma vez que é uma enzima capaz de catalisar inúmeras reações, sendo empregada inclusive na produção de derivados de *mio*-inositol. Vale ressaltar que o emprego da LIPB (enzima que já está sendo produzida em larga escala na Planta Piloto do Laboratório de Biotecnologia Microbiana) como enzima de estudo já vem sendo realizado em estudos paralelos e têm apresentado bons resultados. Além disso, o método de imobilização estudado foi o de adsorção física da enzima aos suportes casca-núcleo, em função da facilidade de imobilização e da obtenção de biocatalisadores com desempenhos promissores, como apresentado na seção anterior.

Dessa forma, o presente trabalho constitui um tema de significativa relevância tecnológica e científica. Além disso, por apresentar uma aplicação direta em diferentes setores (como indústria de fármacos, alimentos, cosméticos), é também de grande interesse comercial, o que corrobora a necessidade de estudar o escalonamento de tais processos.

### **3.2. *Materiais e Metodologias***

O objetivo desta seção é descrever a etapa de imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B). Para isso, são apresentados os materiais usados e as metodologias empregadas no processo de imobilização (imobilização por adsorção física). São mostradas também as análises necessárias para determinação do desempenho dos biocatalisadores produzidos e dos parâmetros de imobilização.

### 3.2.1. *Materiais*

É importante mencionar que todos os reagentes empregados no processo de imobilização e de avaliação das atividades dos biocatalisadores foram utilizados como recebido, sem haver qualquer etapa prévia de purificação. Lipozyme® CALB, a lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B) no estado solúvel, foi fornecida pela Novozymes. O substrato utilizado para a determinação das atividades de hidrólise, laurato de *p*-nitrofenila (*p*-NPL), foi adquirido da Sigma Aldrich Ltda. com uma pureza mínima de 98%. Etanol PA, fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. com pureza mínima de 99,8%, foi utilizado para a lavagem dos suportes poliméricos e também como substrato nas reações de esterificação. O ácido oleico com pureza mínima de 98% foi fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. e foi utilizado como substrato também nas reações de esterificação.

Os suportes poliméricos com morfologia casca-núcleo foram empregados no processo de imobilização nesta etapa do trabalho. Vale ressaltar que tais partículas foram sintetizadas como descrito no Capítulo II e suas características químicas e morfológicas foram apresentadas. Dentre os diferentes materiais poliméricos produzidos, alguns foram selecionados para serem empregados como suporte na imobilização da lipase CAL-B. As características morfológicas de tais suportes são apresentadas na Tabela 17. O suporte comercial à base de polipropileno, Accurel® MP 1000 (chamado em algumas partes do texto apenas de Accurel), foi fornecido por Akzo Nobel Faser AG e foi utilizado para avaliação comparativa de desempenho dos biocatalisadores sintetizados. O biocatalisador comercial, *Novozym 435*, também foi utilizado para comparar o desempenho dos biocatalisadores obtidos a partir do emprego das partículas casca-núcleo.

**Tabela 17.** Características morfológicas dos suportes produzidos e utilizados no processo de imobilização.

Suportes	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)	Volume Específico de Poros (m <sup>3</sup> /g)	Diâmetro Médio de Poro (Å)	Ângulo de Contato (°)
Reação 12: Núcleo; P(S-co-DVB)	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>	- <sup>1</sup>
Reação 13: Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)	43,43	0,2	212,88	- <sup>2</sup>
Reação 14: Nanopartículas; P(S-co-DVB)	112,95	0,4	128,04	- <sup>2</sup>
Reação 16: Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)	51,4	0,29	243,6	107,7 ± 1,7
Piloto 1: Casca-núcleo; PMMA/PMMA	29,9	176,4	0,15	55,9 ± 0,1
Piloto 4: Casca-núcleo; P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)	27,0	222,1	0,16	- <sup>3</sup>
Piloto 5: Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)	5,3	253,3	0,03	105,7 ± 0,8
Accurel	27,4	0,15	189,1	87,7 ± 2,1 <sup>4</sup>
<i>Novozym 435</i>	89,3	0,51	227,0	- <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Tais características morfológicas não foram detectadas por meio da análise realizada;

<sup>2</sup> O ângulo de contato de tais partículas não foi determinado. Contudo, como esses suportes apresentam a mesma composição das partículas produzidas na Reação 16, tais materiais devem apresentar ângulo de contato semelhante a 107,7°;

<sup>3</sup> O ângulo de contato da amostra Piloto 4 não pôde ser detectado, em função da baixa resistência mecânica das pastilhas produzidas;

<sup>4</sup> Dado extraído de Cunha *et al.* (2014);

<sup>5</sup> O grau de hidrofobicidade da *Novozym 435* não foi determinado, pois o biocatalisador já havia sido produzido e as características do suporte, muito provavelmente, já teriam sido alteradas com o processo de imobilização.



Com relação especificamente às etapas de purificação e caracterização dos biocatalisadores produzidos, todos os reagentes e solventes utilizados apresentavam grau analítico, incluindo: acetonitrila, adquirida da Vetec Química Fina Ltda., com pureza mínima de 99,9%, grau UV/HPLC (empregada no preparo da solução de substrato da hidrólise); dimetilsulfóxido (DMSO) com pureza mínima de 99,9%, grau UV/HPLC, fornecido pela Tedia Company Inc. (também utilizado para preparar a solução de substrato da hidrólise); fosfato de sódio monobásico P.A. com pureza mínima de 99%, adquirido da Vetec Química Fina Ltda. (empregado no preparo das soluções de tampão fosfato 5 e 25 mM com pH=7); hidróxido de sódio P.A. com pureza mínima de 99%, fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. (usado para preparar as soluções aquosas de hidróxido de sódio, empregadas para ajuste do pH da solução tampão e como titulante no titulador); acetona P.A. com pureza mínima de 99,5%, adquirida da Vetec Química Fina Ltda. (usada como solvente nas dosagens de atividade de esterificação); biftalato de potássio P.A. com pureza mínima de 99,5%, fornecido pela Vetec Química Fina Ltda. (empregado na determinação para concentração da solução de hidróxido de sódio, utilizada como titulante).

O reagente de Bradford, usado para determinação da concentração de proteína presente nas soluções enzimáticas, foi fornecido pela BioRad. Uma solução padrão de BSA (2 mg/mL), também fornecida pela Bio Rad, foi empregada para construção de uma curva de calibração para determinação da concentração de proteína das soluções do sobrenadante recolhido ao longo da imobilização. Água destilada foi utilizada na lavagem dos suportes e no preparo das diferentes soluções.

### **3.2.2. Metodologia**

#### **3.2.2.1. Metodologia – Imobilização por Adsorção Física**

O procedimento de imobilização por adsorção física, empregado no presente estudo, e a definição dos parâmetros de imobilização são descritos em diversos trabalhos da literatura (CUNHA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2014; MANOEL, 2014). Nesse contexto, uma etapa anterior ao processo de imobilização propriamente dito envolveu a lavagem dos suportes. Esta fase visou a eliminar possíveis resquícios de monômero residual e também a facilitar a penetração da

solução aquosa de enzima para o interior das partículas porosas durante a imobilização enzimática. Assim, inicialmente, 10 mL de etanol eram adicionados a 1 g de suporte polimérico seco. Após 30 minutos, o etanol era removido e eram adicionados 10 mL de água destilada. Uma filtração (empregando-se papel de filtro fornecido pela Qualy, gramatura 80, com poros de diâmetro igual a 14  $\mu\text{m}$ ) era realizada depois de 10 min, fazendo-se a lavagem das partículas com água destilada abundante, para remoção do etanol. Por fim, os suportes eram lavados com tampão de fosfato de sódio (5 mM, pH = 7,0) e mantidos a 17 °C até a realização do procedimento de imobilização.

As atividades iniciais das soluções enzimáticas, empregadas no início da imobilização, foram alteradas, havendo aumento da carga proteica, a depender do suporte empregado, como apresentado na **Seção 3.3**. A alteração da atividade enzimática inicial baseou-se nos resultados obtidos por CUNHA (2011). Neste estudo foi observada uma diminuição da retenção de atividade de hidrólise dos biocatalisadores sintetizados quando a atividade enzimática inicial aumentou de 100 U/g<sub>suporte</sub> para 200 U/g<sub>suporte</sub>, empregando-se *p*-NPL como substrato e partículas de poliestireno. Possivelmente em função da área específica restrita desses suportes, camadas de enzimas foram formadas umas sobre as outras, obstruindo parte dos sítios ativos das enzimas e provocando a queda de atividade dos biocatalisadores, fenômeno conhecido por *overcrowding* (XU e DING, 2007). Uma vez que foi possível aumentar a área específica dos suportes produzidos, em decorrência das diferentes estratégias de polimerização usadas, aumentou-se a carga enzimática inicial e foi realizado um estudo sobre a avaliação da carga enzimática máxima suportada por tais partículas. Para isso, a solução de enzima comercial era diluída em diferentes concentrações, mostradas na **Seção 3.3**, utilizando tampão de fosfato de sódio (5 mM e pH 7,0). Como já foi mencionado, as imobilizações foram realizadas em meio com baixa força iônica (tampão fosfato de sódio 5mM e pH 7,0), pois foi percebido que a velocidade de imobilização de lipases é máxima em meios sujeitos a baixa força iônica frente às demais proteínas do extrato enzimático (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 1998).

O processo de imobilização era iniciado a partir da adição de 10 mL de solução enzimática, apresentado a atividade de hidrólise desejada, a 1 g de suporte tratado. A imobilização era conduzida por 25 h, sob agitação suave (sistema de rolos cuja velocidade foi de aproximadamente 36 rpm) a 4 °C. A temperatura baixa visava a evitar a possível desnaturação da enzima durante o processo de imobilização. Durante o levantamento da cinética de imobilização da enzima (0, 0,5 h, 1 h, 3 h, 6 h, 25 h), alíquotas de 150  $\mu\text{L}$  eram

coletadas para dosagem de atividade hidrolítica da enzima ainda presente na fase aquosa (ou seja, no sobrenadante), usando para este fim o *p*-NPL como substrato. Finalmente, os biocatalisadores (enzimas já imobilizadas) obtidos ao final das 25 h de contato eram lavados com água destilada (para remoção das enzimas presentes na superfície e que não foram adsorvidas), filtrados (empregando papel de filtro Nalgon, gramatura 80, com porosidade de 3  $\mu\text{m}$ ), secos em dessecadores e armazenados na geladeira (17 °C). A unidade experimental empregada no processo de imobilização enzimática é apresentada na Figura 55.



**Figura 55.** Unidade experimental empregada para a imobilização enzimática.

É importante pontuar que, para as imobilizações realizadas no suporte P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB) (Reação 16), só foram analisadas as amostras referentes ao início e ao término do processo de imobilização. Nesta etapa, o objetivo principal era avaliar a atividade final do biocatalisador e não a cinética de imobilização.

### ***3.2.3. Avaliação de Desempenho dos Biocatalisadores Produzidos***

Como mencionado anteriormente, os diversos biocatalisadores produzidos foram avaliados quanto ao desempenho em reações de hidrólise e de esterificação. Dessa forma, as diferentes reações realizadas são descritas nesta seção. O cálculo empregado para determinação dos parâmetros de imobilização, como rendimento de imobilização e

retenção de atividade, também é mostrado. As metodologias utilizadas para determinação das cinéticas de imobilização dos diferentes processos realizados também são apresentadas. Vale salientar que as análises cinéticas foram realizadas, baseando-se tanto nas atividades de hidrólise da enzima quanto na quantidade de proteína ainda presente na forma solúvel (sobrenadante) ao longo da imobilização. A atividade de esterificação da enzima solúvel, para o acompanhamento da cinética de imobilização, não é viável em função da impossibilidade observar a evolução dinâmica da atividade da enzima solúvel em meio alcoólico.

### **3.2.3.1. Cinética de Imobilização Avaliada por Atividade Hidrolítica**

A metodologia utilizada nesta etapa do trabalho baseou-se em alguns trabalhos da literatura (CUNHA *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009; CUNHA *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2014; MANOEL, 2014). A cinética de imobilização foi determinada, dosando-se a atividade de hidrólise da enzima remanescente no sobrenadante, utilizando como substrato o *p*-NFL (*p*-nitrofenil laurato). Essa reação hidrolítica gera no meio reacional um produto de coloração amarela, o *p*-nitrofenol. Assim, por meio de um método espectrofotométrico, foi possível determinar a quantidade de produto formada em cada tempo de amostragem; logo, a atividade da enzima ainda presente na fase solúvel ao longo da imobilização.

Inicialmente, foi construída uma curva de calibração, relacionando as diferentes concentrações de *p*-nitrofenol em uma solução tampão 25 mM a 30 °C às absorvâncias correspondentes ( $\lambda=412$  nm). Assim, foi possível determinar o fator de correlação “*f*” entre essas duas variáveis, que deve ser empregado nos cálculos que serão apresentados.

Vale salientar que o espectrofotômetro utilizado para dosagem da atividade de hidrólise das enzimas foi fornecido pela empresa Shimadzu, modelo UV-1800. Um banho de aquecimento com recirculação e controle de temperatura (fornecido pela empresa Ética, modelo 521-2D) foi acoplado ao espectrofotômetro e foi utilizado para manter a temperatura do sistema em 30 °C, temperatura em que foram realizadas as dosagens de atividade hidrolítica.

Uma etapa anterior à dosagem da atividade enzimática das alíquotas envolveu o preparo da solução de substrato (composto por 0,016 g de *p*-NFL, 10 mL de acetonitrila e 10 mL de dimetilsulfóxido). Para iniciar a dosagem, eram adicionados, então, a uma

cubeta de vidro de 3 mL, 2,2 mL de solução tampão fosfato de sódio (25 mM e pH=7,0) e 0,25 mL da solução de substrato. A cubeta era acoplada ao espectrofotômetro, sendo formada uma linha de base após aproximadamente 0,5 min. Após este período, 0,05 mL da solução enzimática eram adicionados à cubeta, iniciando-se a reação. A evolução dinâmica de cada reação foi acompanhada a partir do gráfico de absorvância fornecido pelo espectrofotômetro (com  $\lambda=412$  nm). As análises foram realizadas em triplicata para cada tempo de amostragem. Vale ressaltar que, como alguns resultados apresentaram desvio expressivo, resultando em aumento pronunciado do erro experimental, alguns resultados foram obtidos a partir da média das duplicatas dos resultados mais próximos.

O cálculo para determinação da atividade de hidrólise das enzimas na forma solúvel é apresentado na Equação 3. É importante destacar que uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima necessária para catalisar a formação de 1,0  $\mu\text{mol}$  de produto (no caso, *p*-nitrofenol) por minuto nas condições operacionais mencionadas (1 UI, Unidade Internacional, ou simplesmente 1 U).

$$A_H = \frac{\left(\frac{Abs}{min}\right) * V_f * f}{V_e}$$

**Equação 3.** Cálculo da atividade de hidrólise da enzima solúvel.

sendo:  $A_H$ , a atividade hidrolítica (UI/ml), que pode ser obtida em (UI/g<sub>suporte</sub>) caso o valor em (UI/ml) seja multiplicado por 10 e dividido pela massa de suporte (pois foram utilizados aproximadamente 10 mL de solução enzimática por grama de suporte em cada imobilização);  $V_f$ , o volume final do meio reacional (ml);  $f$ , fator obtido a partir da curva de calibração do *p*-nitrofenol em tampão 25 mM a 30 °C;  $V_e$ , volume de enzima devidamente diluída (mL);  $(Abs/min)$ , o coeficiente angular da reta obtida com o avanço da reação de hidrólise.

Para determinar um dos parâmetros de imobilização, o rendimento de imobilização de cada processo de imobilização, foi empregada a Equação 4.

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

**Equação 4.** Cálculo do rendimento de imobilização.

sendo:  $\eta$ , o rendimento de imobilização (%);  $U_{teo}$ , a atividade da enzima que teoricamente foi adsorvida ao suporte (UI/g<sub>suporte</sub>);  $U_e$ , a atividade da solução enzimática presente no sobrenadante no início do processo de imobilização (UI/g<sub>suporte</sub>);  $U_s$ , a atividade da enzima presente no sobrenadante ao final do processo de imobilização (UI/g<sub>suporte</sub>).

### 3.2.3.2. Atividade de Hidrólise do Biocatalisador

Como mencionado anteriormente, após a síntese dos biocatalisadores, a atividade hidrolítica das enzimas imobilizadas foi analisada. Para isso, inicialmente 9 mL de tampão de fosfato de sódio (25 mM, pH = 7,0) e 1 mL de a solução de substrato (*p*-NFL) eram adicionados a um reator. Em seguida, aproximadamente 10 mg do biocatalisador também eram adicionados ao reator, iniciando a reação de hidrólise propriamente dita. As reações foram realizadas em batelada sob agitação suave (aproximadamente 250 rpm) a 30 °C, sendo empregado para isso um banho térmico com controle de temperatura (modelo 521-2D, fornecido pela empresa Ética). Alíquotas de 700 µL eram coletadas ao longo da reação por aproximadamente 6 min e adicionadas à cubeta de vidro de 1 mL. A absorvância ( $\lambda=412$  nm) correspondente a cada alíquota foi novamente determinada com auxílio do espectrofotômetro (UV-1800 modelo, fornecido pela Shimadzu) operando a uma temperatura de 30 °C (temperatura assegurada pelo acoplamento de um banho térmico ao equipamento). Os experimentos foram realizados em triplicata.

É importante notar que uma unidade de atividade enzimática corresponde à quantidade de enzima necessária para produzir 1 µmol de *p*-nitrofenol por minuto sob as condições operacionais descritas (1 UI ou 1 U). Também vale mencionar que a unidade U/g<sub>suporte</sub> é relacionada à atividade enzimática associada a 1 g de suporte polimérico. Já a unidade U/g<sub>bio</sub> corresponde à atividade enzimática de 1 g de biocatalisador (ou seja, após o processo de imobilização da enzima).

A determinação da atividade de hidrólise do biocatalisador foi realizada a partir da Equação 5.

$$A_{imohid} = \frac{\left(\frac{Abs}{min}\right) * V_f * f}{m_e}$$

**Equação 5.** Cálculo da atividade hidrolítica do biocatalisador.

sendo:  $A_{imohid}$ , a atividade hidrolítica do biocatalisador (UI/g<sub>bio</sub>);  $V_f$ , o volume final do meio reacional (ml);  $f$ , fator obtido a partir da curva de calibração do *p*-nitrofenol em tampão 25 mM a 30 °C;  $m_e$ , massa de enzima imobilizada, de biocatalisador (g);  $(Abs/min)$ , coeficiente angular da reta que descreve o avanço da reação hidrolítica, correspondente à velocidade inicial de reação.

A retenção de atividade, outro parâmetro de imobilização, pôde ser determinada por meio da Equação 6,

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

**Equação 6.** Cálculo da retenção de atividade.

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

### 3.2.3.3. Atividade de Esterificação do Biocatalisador

Os biocatalisadores também foram avaliados quanto à atividade de esterificação, uma vez que se objetiva empregar tais biocatalisadores para a síntese de diferentes ésteres de interesse comercial. As reações foram conduzidas em modo batelada, em reatores de vidro de 50 mL encamisados, sob agitação suave (aproximadamente a 250 rpm) a 40 °C. A temperatura do meio reacional foi garantida por um banho de aquecimento fornecido pela empresa PolyScience, modelo 911. Para a realização de cada reação de esterificação, ácido oleico (10,1 mL) e etanol (1,9 mL) (1 mol : 1 mol) foram utilizados como substratos. O início da reação era determinado a partir da adição de 0,2 g de biocatalisador ao meio

reacional. Aliquotas de 100 µL eram coletadas ao longo da reação para determinação das atividades correspondentes (0, 10 min, 20 min, 30 min, 40 min, 60 min). A análise de cada ponto de amostragem foi realizada em triplicata.

A dosagem de cada amostra era iniciada após a adição de cada alíquota coletada a aproximadamente 40 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) (v/v). Esses solventes são necessários para extrair o ácido oleico não consumido presente no meio reacional, possibilitando a dosagem no titulador. Em seguida, tais amostras eram inseridas em um titulador automático (modelo G-20, Mettler Toledo), operando com NaOH (0,02 M), utilizado como agente titulante. Dessa forma, era possível fazer a determinação da concentração de ácido oleico presente em cada alíquota. Como o produto da reação de esterificação era um éster, ao longo da reação catalisada pelo biocatalisador ocorria a diminuição da acidez do meio reacional, sendo determinada a atividade do biocatalisador. As reações foram realizadas em triplicata.

É importante notar que uma unidade de atividade enzimática (1 UI ou 1U) corresponde à quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de oleato de etila (produto da reação de esterificação) por minuto sob as condições operacionais descritas. A unidade U/g<sub>bio</sub> corresponde à atividade enzimática de 1 g de biocatalisador (após a imobilização enzimática). Para o cálculo da atividade de esterificação foi empregada a Equação 7. Vale ressaltar que a atividade da enzima imobilizada ( $A_{imoester}$ ) deve ser determinada apenas na região linear de concentração de produtos.

$$A_{imoester} = \frac{(V_{NaOH0} - V_{NaOHt}) * C_{NaOH} * V_f * 1000}{V_e * t * m_e}$$

**Equação 7.** Cálculo da atividade de esterificação da enzima imobilizada.

sendo:  $A_{imoester}$ , a atividade de esterificação do biocatalisador (UI/g<sub>bio</sub>);  $V_{NaOH0}$ , o volume de titulante utilizado para titular a solução correspondente a alíquota de 0 min (mL);  $V_{NaOHt}$ , o volume de titulante utilizado para titular a solução correspondente a alíquota do tempo de amostragem t (mL);  $C_{NaOH}$ , a concentração real da solução de hidróxido de sódio após ser padronizada com biftalato de potássio (mol/L);  $V_f$ , volume final do meio reacional (mL);  $V_e$ , volume da alíquota retirada para titulação (mL);  $t$ , tempo de amostragem (min);  $m_e$ , massa de biocatalisador utilizada na reação (g).



### 3.2.3.4. Cinética de Imobilização Avaliada por Concentração de Proteína

A cinética de imobilização também pode ser monitorada usando como base a concentração de proteína presente no sobrenadante durante o processo de imobilização. O objetivo principal de tal análise é confirmar os resultados encontrados, baseando-se na atividade de hidrólise da enzima solúvel, e assim verificar se houve perda de atividade ao longo da imobilização ou maior adsorção de proteína. Para isso, o conhecido método de Bradford foi empregado (BRADFORD, 1976).

Inicialmente, uma curva de calibração foi montada, usando como padrão a albumina de soro bovino (BSA) no comprimento de onda  $\lambda=595$  nm, sendo possível a determinação do fator de calibração  $k$ . Para isso, foi utilizado o espectrofotômetro fornecido pela BioTek, modelo Power Wave XS. Após esta etapa, as alíquotas coletadas ao longo da imobilização eram analisadas. Para a dosagem da concentração de proteína, era realizada a mistura de 190  $\mu\text{L}$  da solução de Bradford e 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra em uma placa de acrílico. Esta placa era, então, conduzida ao espectrofotômetro, onde as leituras eram realizadas também com  $\lambda=595$  nm. É importante mencionar que cada alíquota foi analisada em triplicata. Para calcular a quantidade de proteína presente em cada ponto de amostragem foi utilizada a Equação 8.

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

**Equação 8.** Cálculo da concentração de proteína ainda presente no sobrenadante.

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

Vale destacar que, para determinar a quantidade teórica de proteína retida no suporte polimérico, é preciso apenas calcular a diferença entre as concentrações de proteína (mg/mL) presentes no sobrenadante nos tempos inicial e final da imobilização, multiplicar o valor obtido por 10 e dividir pela massa de suporte, uma vez que a cada grama de suporte polimérico são empregados aproximadamente 10 mL de solução enzimática.

### **3.3. Resultados**

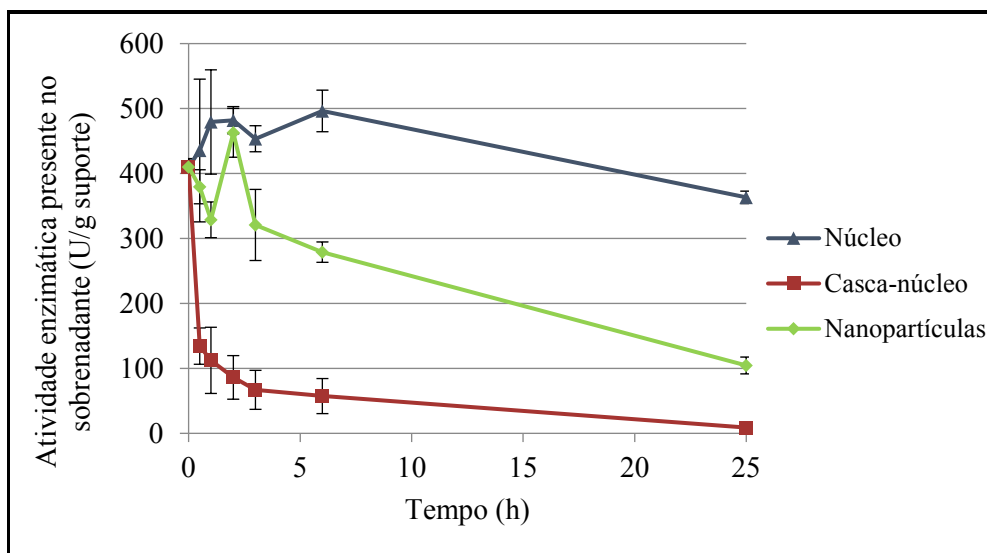
Como mencionado na seção anterior, alguns suportes poliméricos, selecionados a partir do estudo mostrado no **Capítulo II**, foram empregados no processo de imobilização da enzima comercial lipase B de *Candida antarctica*. Esta seção foi subdividida em três subseções. Na **Seção 3.3.1** são apresentados os resultados de imobilização enzimática, empregando como suporte apenas as partículas formadoras do núcleo, as nanopartículas da casca polimérica e as partículas casca-núcleo propriamente ditas. Esta etapa do estudo visou a avaliar a eficácia do emprego das partículas produzidas por polimerização em suspensão e emulsão simultâneas no processo de imobilização.

Na **Seção 3.3.2** foi selecionado o suporte que apresentou maiores área específica e porosidade dentre os suportes produzidos em escala bancada e foram avaliadas diferentes cargas enzimáticas, objetivando avaliar a carga enzimática máxima de adsorção no suporte e sintetizar biocatalisadores ainda mais ativos.

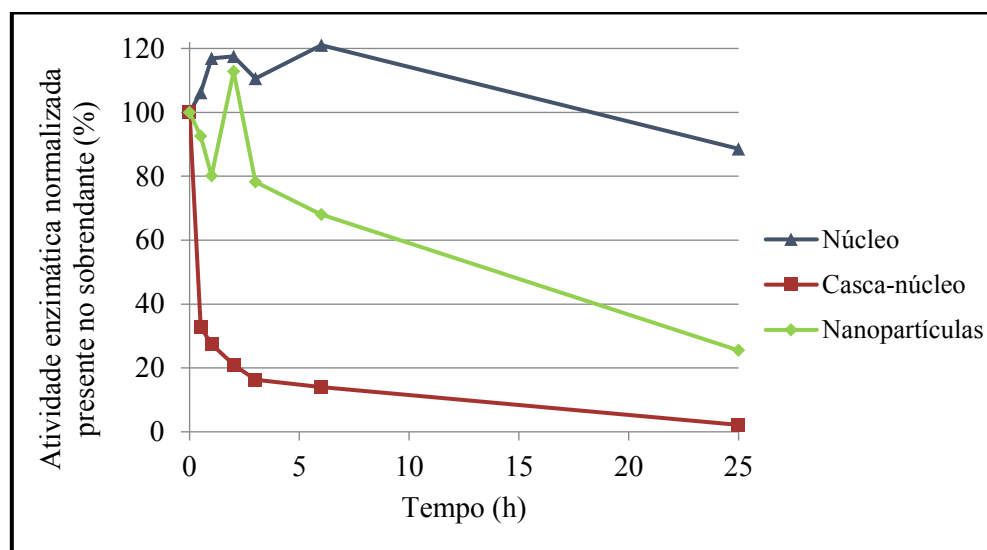
Por fim, na **Seção 3.3.3** são apresentados os resultados da imobilização enzimática utilizando os suportes produzidos em larga escala. Como mencionado, foram selecionados os suportes que apresentaram composições distintas. Foram empregados também o suporte comercial, Accurel, e o biocatalisador comercial, *Novozym 435*, para avaliar e comparar o desempenho dos biocatalisadores sintetizados a partir do emprego dos suportes casca-núcleo.

#### **3.3.1. Avaliação do Desempenho das Partículas Casca-Núcleo**

Nesta seção foram empregadas como suportes as partículas formadoras do núcleo, as nanopartículas formadoras da casca polimérica e as partículas com morfologia casca-núcleo no processo de imobilização. São apresentadas nas Figuras 56A e 56B as cinéticas de imobilização para cada uma das imobilizações realizadas, baseadas nos valores de atividade hidrolítica.



(A)



(B)

**Figura 56.** Análise cinética das imobilizações realizadas, baseando-se na atividade de hidrólise ainda presente no sobrenadante ao longo do período de imobilização: **(A)** Valores absolutos (U/g<sub>suporte</sub>); **(B)** Valores normalizados pela atividade enzimática inicial.

Na Figura 56A é apresentada a queda da atividade de hidrólise no sobrenadante ao longo da imobilização enzimática, baseando-se nos valores absolutos da atividade hidrolítica. Na Figura 56B é mostrada a mesma queda de atividade, mas os dados foram normalizados pela atividade no início da imobilização.

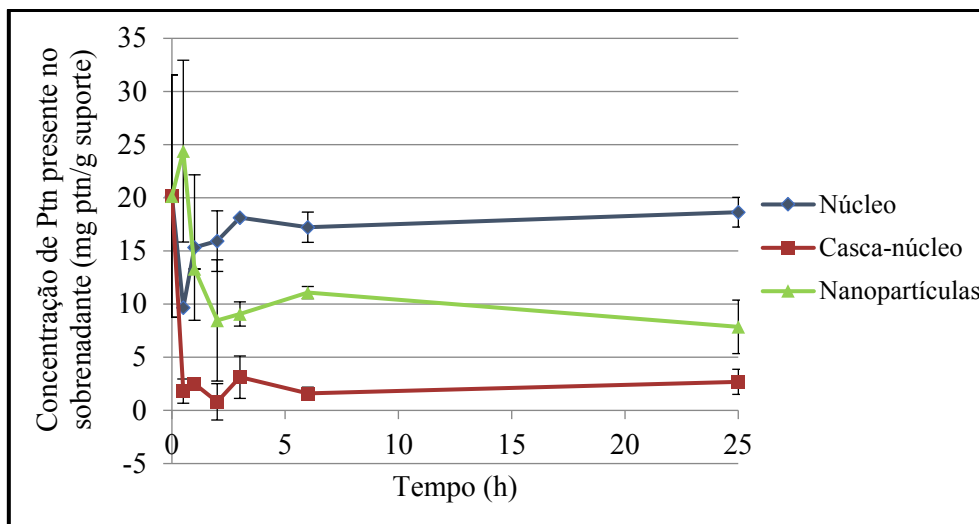
Pode-se perceber primeiramente que, como esperado, as partículas do núcleo são as que adsorvem menor quantidade de enzima, uma vez que apresentam área específica

próxima a zero. Ainda assim, em função das forças de interação existentes entre a lipase e a superfície hidrofóbica do suporte, há adsorção de enzima ao longo do tempo de imobilização (atingindo 11% ao fim do processo de imobilização). As nanopartículas formadoras da casca adsorvem uma expressiva carga enzimática, aproximadamente igual a 80% da atividade inicial, uma vez que apresentam a área específica elevada, acima de 100 m<sup>2</sup>/g. Já as partículas casca-núcleo, apesar de apresentarem área específica inferior a das nanopartículas da casca, são as partículas que adsorvem maior carga de enzima (84% em apenas 3 h de imobilização, atingindo 98% ao final das 25h). Possivelmente, sua estrutura porosa possibilita uma imobilização enzimática também na região mais interna do suporte, dificultando a dessorção dessas proteínas. Em contrapartida, nas nanopartículas, que exibem área específica mais expressiva, as enzimas estão adsorvidas na superfície externa do suporte, estando mais expostas ao meio reacional e mais sujeitas à dessorção ao longo da imobilização.

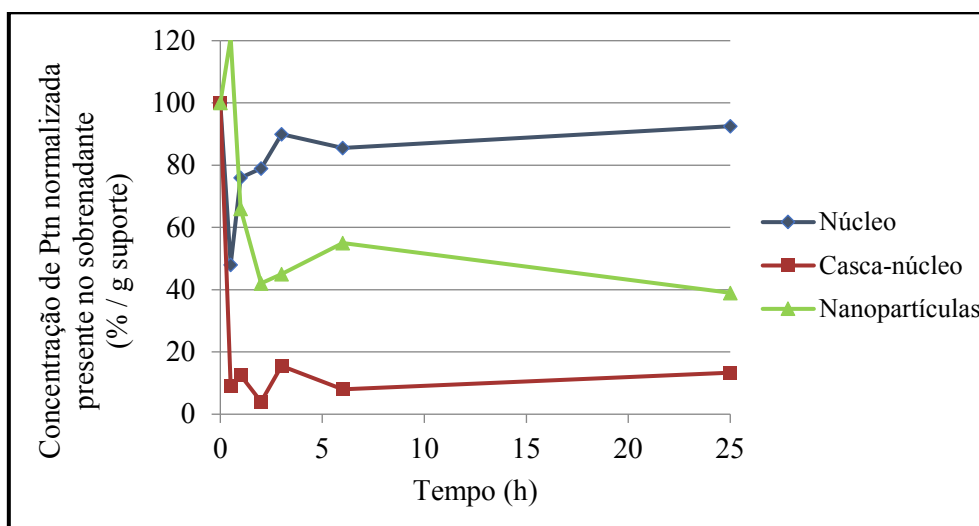
É importante destacar que, segundo BRÍGIDA (2010), a enzima comercial CAL-B apresenta elevada estabilidade a 25°C. Dessa forma, como todas as imobilizações foram conduzidas a baixas temperaturas, a queda observada na atividade enzimática está associada a uma maior carga de enzima adsorvida ao suporte e não à desnaturação dessa proteína.

Análise similar à anterior foi realizada, mas acompanhando a diminuição da carga proteica no sobrenadante ao longo da imobilização, como mostrado na Figura 57. Vale destacar que no texto, muitas vezes, a palavra “proteína” é representada por Ptn.

Nota-se nas Figuras 57A e 57B que os resultados obtidos corroboram a análise anterior. As partículas do núcleo adsorvem menor quantidade de proteína, aproximadamente 7% ao fim da imobilização. Em contrapartida, o suporte que apresenta maior adsorção proteica são as partículas casca-núcleo. É possível observar que esses suportes adsorvem aproximadamente 84% da carga proteica inicial em 3 h, evidenciando a rápida cinética de imobilização nessas partículas, atingindo 91% ao final do processo de imobilização. Possivelmente, a estrutura porosa dessas partículas possibilita a adsorção proteica, mas dificulta a dessorção das proteínas ao longo da imobilização. Dessa forma, um estudo sobre o nível de saturação do suporte pela enzima estudada é incentivado.



(A)



(B)

**Figura 57.** Análise cinética das imobilizações realizadas, baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização: **(A)** Valores absolutos ( $\text{mg}_{\text{ptn}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ ); **(B)** Valores normalizados pela concentração inicial de proteína.

Os diferentes parâmetros de imobilização encontrados para as imobilizações realizadas são apresentados na Tabela 18. Como apresentado nos gráficos anteriores, o rendimento de imobilização das partículas casca-núcleo foi o mais elevado, assim como apresentou maior carga proteica retida no suporte. Observa-se também que, apesar das partículas do núcleo polimérico apresentarem o menor rendimento de imobilização, elas apresentam também a maior retenção de atividade, resultado similar ao observado por PINTO *et al.* (2013). Muito provavelmente em função das elevadas taxas de reação

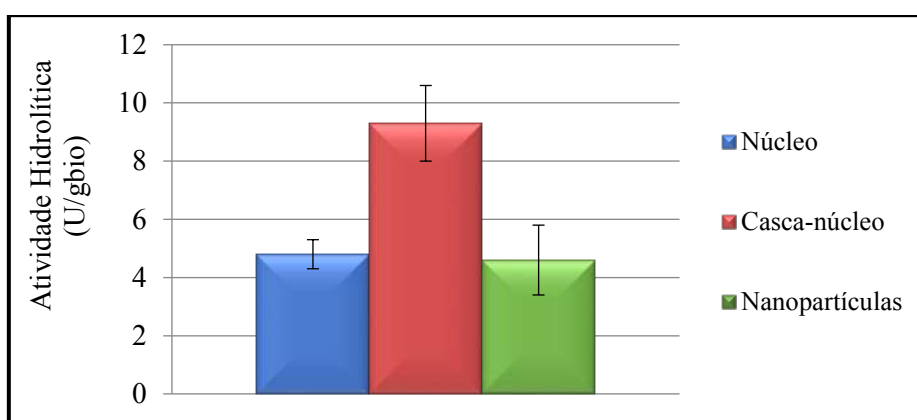
hidrolítica e da ausência de limitações difusionais nas partículas rígidas do núcleo, as poucas enzimas adsorvidas a sua superfície estão localizadas na região mais externa das partículas, mais expostas ao meio reacional e aos substratos, exibindo uma atividade hidrolítica mais pronunciada. Nas partículas casca-núcleo provavelmente uma quantidade expressiva de produto é gerada, permanecendo na superfície do biocatalisador.

Na Tabela 18 são mostradas também as atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores produzidos. Nota-se inicialmente que as enzimas imobilizadas exibem baixas atividades de hidrólise, principalmente quando comparadas com os valores obtidos nas reações de esterificação. Essa baixa atividade hidrolítica é decorrente do substrato empregado em tais reações, *p*-NFL. A atividade de hidrólise da CAL-B comercial é geralmente mais intensa quando substratos de cadeia mais curta são empregados, como o butirato de *p*-nitrofenila. Contudo, é importante ressaltar que a CAL-B é uma enzima empregada principalmente na catálise de reações de síntese orgânica, exibindo atividade mais pronunciada em reações de esterificação. A determinação da atividade de hidrólise é relevante para acompanhar o processo de imobilização ao longo do tempo e definir parâmetros de imobilização, como retenção de atividade, sendo que a determinação da atividade de esterificação da enzima solúvel é inviável a partir da metodologia adotada, como mencionado anteriormente.

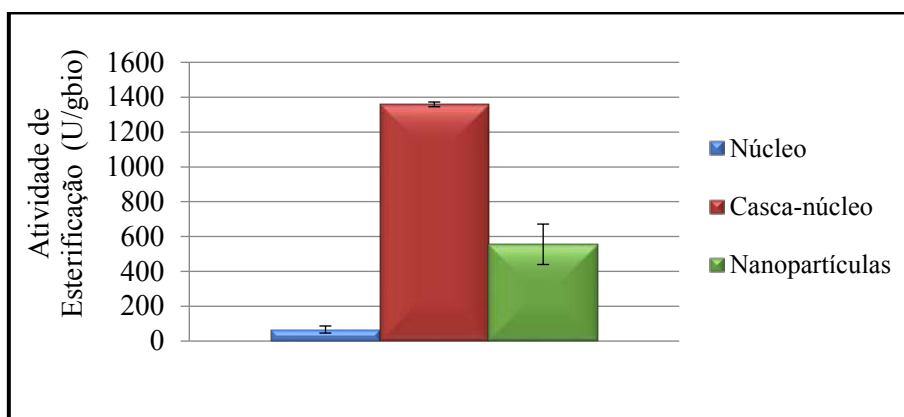
**Tabela 18.** Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações.

Legenda	Uentrada (U/gsuporte)	Uteórico (U/gsuporte)	Rendimento de Imobilização (%)	Retenção de Atividade Hidrolítica (%)	Conc. Ptn inicial (mg/gsuporte)	Conc. Ptn retida no suporte (mg/gsuporte)	Atividade de Hidrólise Biocatalisador (U/gbio)	Atividade de Esterificação Biocatalisador (U/gbio)
Núcleo	410,1 ± 12,8	46,8	11,4	10,3	20,2 ± 11,4	1,5	4,8 ± 0,5	66,4 ± 20,4
Casca-núcleo	410,1 ± 12,8	401,2	97,8	2,3	20,2 ± 11,4	17,5	9,3 ± 1,3	1358,7 ± 13,6
Nanopartículas	410,1 ± 12,8	305,6	74,5	1,5	20,2 ± 11,4	12,3	4,6 ± 1,2	555,6 ± 116

Para facilitar a comparação do desempenho dos biocatalisadores produzidos nas reações de hidrólise e esterificação é apresentada a Figura 58. Na Figura 58A observa-se a atividade de hidrólise pronunciada dos biocatalisadores produzidos a partir do uso das partículas casca-núcleo. A atividade hidrolítica observada quando partículas do núcleo são empregadas como suporte está associada às enzimas imobilizadas na superfície de tais materiais. Vale ressaltar que BESTETI (2011) empregou apenas os suportes poliméricos (sem enzimas) em reações de hidrólise e confirmou a ausência de atividade exibida apenas por essas partículas. Dessa forma, a atividade observada é decorrente da atividade catalítica das enzimas imobilizadas.



(A)



(B)

**Figura 58.** Atividade dos biocatalisadores produzidos considerando o primeiro bloco de imobilizações: **(A)** Hidrólise; **(B)** Esterificação.

Nota-se também na Figura 58A que, apesar das nanopartículas adsorverem uma quantidade expressiva de enzima durante o processo de imobilização, a atividade do



biocatalisador sintetizado é similar à do biocatalisador produzido quando apenas partículas do núcleo são empregadas. Muito provavelmente, para esses sistemas não há surgimento de microambientes que protejam a estrutura das enzimas. Dessa forma, as enzimas imobilizadas estão expostas às condições do meio reacional e mais susceptíveis a fenômenos de desativação e dessorção.

Ao analisar os resultados das atividades de esterificação, na Figura 58B, percebe-se que novamente as partículas casca-núcleo são as que exibem as maiores atividades de esterificação. Vale lembrar que foram essas partículas que adsorveram maior carga enzimática durante a imobilização. Dessa forma, percebe-se que, apesar da menor área (quando comparadas às nanopartículas formadoras da casca), as partículas casca-núcleo apresentam as condições morfológicas mais favoráveis para o processo de imobilização da enzima estudada e para a síntese dos correspondentes biocatalisadores.

### ***3.3.2. Avaliação da Carga Máxima Enzimática Adsorvida ao Suporte***

A partir dos resultados apresentados na seção anterior, percebe-se a eficácia do emprego de partículas casca-núcleo para síntese de biocatalisadores enzimáticos, estimulando a realização de um estudo mais aprofundado para produção de biocatalisadores ainda mais ativos. Dessa forma, foi selecionado o suporte que apresentou as maiores área específica e porosidade dentre os suportes produzidos em escala de bancada (Reação 16) e foram avaliadas cargas enzimáticas crescentes. Como mencionado, para este bloco de imobilizações só foram analisadas as amostras referentes ao início e ao término do processo de imobilização, uma vez que a cinética de imobilização deveria seguir perfil semelhante ao apresentado pelas partículas casca-núcleo do bloco anterior (*Seção 3.3.1*).

Os diferentes parâmetros encontrados em cada uma das imobilizações realizadas são apresentados na Tabela 19. Percebe-se inicialmente que o rendimento de imobilização é mantido praticamente constante, apesar do aumento pronunciado na carga enzimática inicial, o que indica que a saturação do suporte pela enzima de estudo, mesmo empregando elevada carga enzimática, ainda não foi atingida. No entanto, ao observar a concentração de proteína retida no suporte para as diferentes imobilizações realizadas, nota-se que, mesmo quando quantidades expressivas de proteína são adicionadas no início do processo de imobilização, a quantidade de proteína retida no suporte é praticamente

constante. Esse comportamento pode indicar a adsorção preferencial das lipases nos suportes hidrofóbicos ao longo do processo de imobilização. Assim, o aumento da carga enzimática inicial é acompanhado pelo aumento atividade da enzima retida no suporte (Uteórico), enquanto a quantidade de proteína retida permanece praticamente constante. Comportamento similar foi observado por FERNANDEZ-LAFUENTE *et al.* (1998) e PINTO *et al.* (2014).

Nota-se também a diminuição na retenção de atividade com o aumento da carga proteica. Este fato deve estar relacionado ao aumento das limitações difusionais. Assim, apesar do suporte apresentar maior carga enzimática, parte do produto gerado permanece na superfície do biocatalisador.

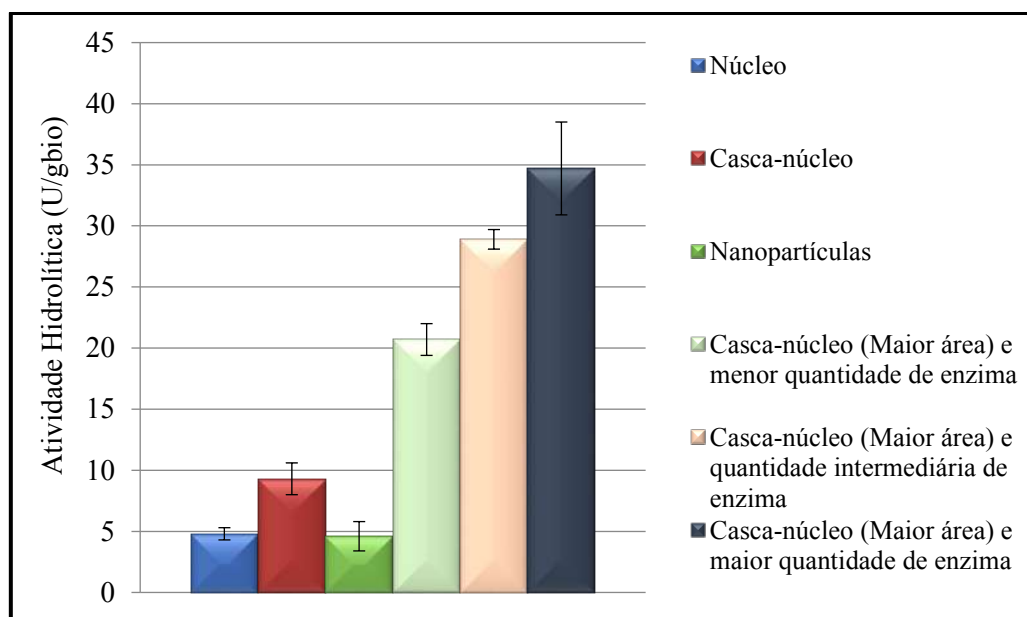
É importante destacar que o diâmetro médio de poro dos suportes utilizados no processo de imobilização deve sempre ser analisado, uma vez que ele deve permitir o acesso da enzima para a região mais interna da casca polimérica, sem provocar deformações na estrutura. As partículas poliméricas produzidas (Reação 16) apresentaram diâmetro médio de poro de 243,6 Å. Segundo MOJOVIC *et al.* (1998), as lipases podem ser consideradas esferas com diâmetros que variam na faixa de 50 a 70 Å. Dessa forma, percebe-se que o diâmetro médio das partículas foi muito superior ao tamanho da enzima estudada, não devendo interferir no processo de imobilização.

De forma a facilitar a comparação das diferentes atividades de hidrólise dos biocatalisadores produzidos, é mostrada a Figura 59. Inicialmente, percebe-se que o aumento da carga enzimática resulta em biocatalisadores mais ativos (ao comparar os resultados da seção anterior com os dados da presente seção). Possivelmente, a maior área exibida pelos biocatalisadores produzidos neste segundo bloco de imobilizações resultou em microambientes que favoreceram a maior exposição do sítio ativo das enzimas, havendo um aumento da atividade hidrolítica dos biocatalisadores produzidos, principalmente quando se comparam os resultados encontrados para as partículas casca-núcleo (do primeiro bloco de imobilizações) e partículas casca-núcleo com menor quantidade de enzima (do grupo de imobilizações descrito na presente seção).

Ao analisar especificamente os resultados encontrados no presente bloco de imobilizações, observa-se que o aumento na carga enzimática inicial provocou aumento expressivo da atividade hidrolítica dos biocatalisadores produzidos, uma vez que, como mostrado anteriormente, maior concentração de enzima foi adsorvida ao suporte.

**Tabela 19.** Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações realizadas no segundo bloco de imobilizações.

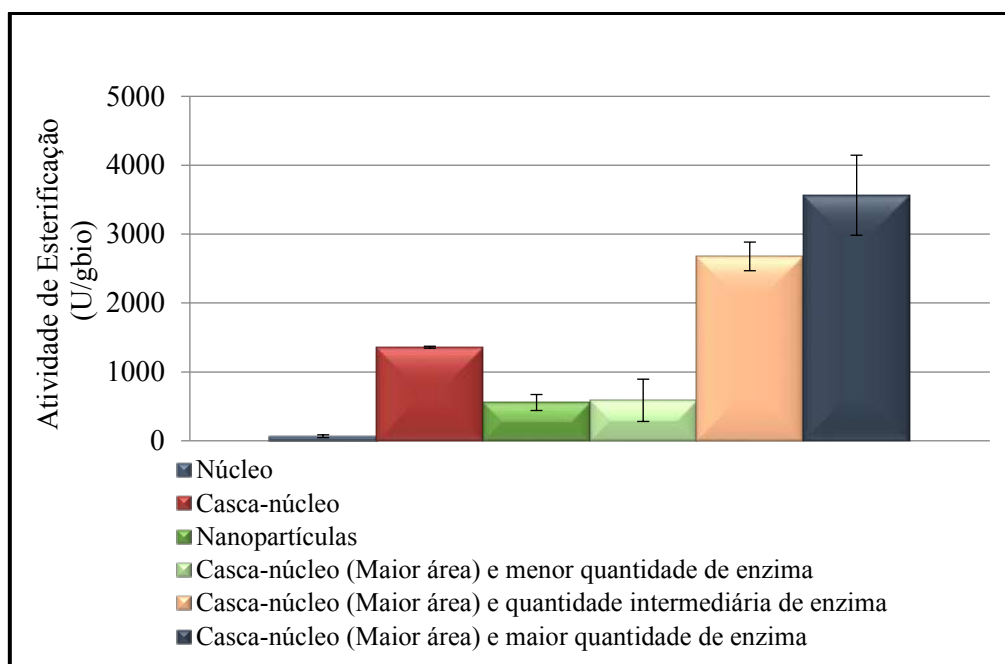
Legenda	Uentrada (U/gsuporte)	Uteórico (U/gsuporte)	Rendimento de Imobilização (%)	Retenção de Atividade Hidrolítica (%)	Conc. Ptn inicial (mg/gsuporte)	Conc. Ptn retida no suporte (mg/gsuporte)	Atividade de Hidrólise Biocatalisador (U/gbio)	Atividade de Esterificação Biocatalisador (U/gbio)
Reação 16_1 Casca-núcleo (maior área) e menor quantidade de enzima	341,6 ± 48,6	340,9	99,8	6,1	19,5 ± 2,0	18,3	20,7 ± 1,3	587,6 ± 307,0
Reação 16_2 Casca-núcleo (maior área) e quantidade intermediária de enzima	521,8 ± 60,6	519,3	99,5	5,6	26,5 ± 1,4	24,5	28,9 ± 0,8	2676,5 ± 207,8
Reação 16_3 Casca-núcleo (maior área) e maior quantidade de enzima	709,6 ± 70,6	706,7	99,6	4,9	43,3 ± 0,0	21,2	34,7 ± 3,8	3564,6 ± 581,0



**Figura 59.** Atividade de hidrólise dos biocatalisadores produzidos considerando o primeiro e o segundo blocos de imobilizações.

As atividades de esterificação dos biocatalisadores produzidos são mostradas na Figura 60. É possível observar inicialmente que biocatalisadores ainda mais ativos foram produzidos neste bloco de imobilizações, quando comparados com as imobilizações da seção anterior. Nota-se também que os valores das atividades de esterificação foram bem mais expressivos que os da atividade de hidrólise, como discutido anteriormente.

Ao analisar o conjunto de imobilizações realizadas nesta seção, percebe-se um comportamento similar ao observado para a atividade de hidrólise: o aumento na carga enzimática inicial provocou aumento da atividade de esterificação da enzima imobilizada, em função da maior quantidade de lipase retida ao suporte. A mesma reação de esterificação foi conduzida empregando como catalisador o biocatalisador comercial, *Novozym 435*. Para este biocatalisador, foi obtida uma atividade de esterificação de  $2384,7 \pm 307,2$  U/gbio; atividade levemente inferior à obtida para o biocatalisador produzido a partir das partículas casca-núcleo, empregando maior quantidade de enzima.



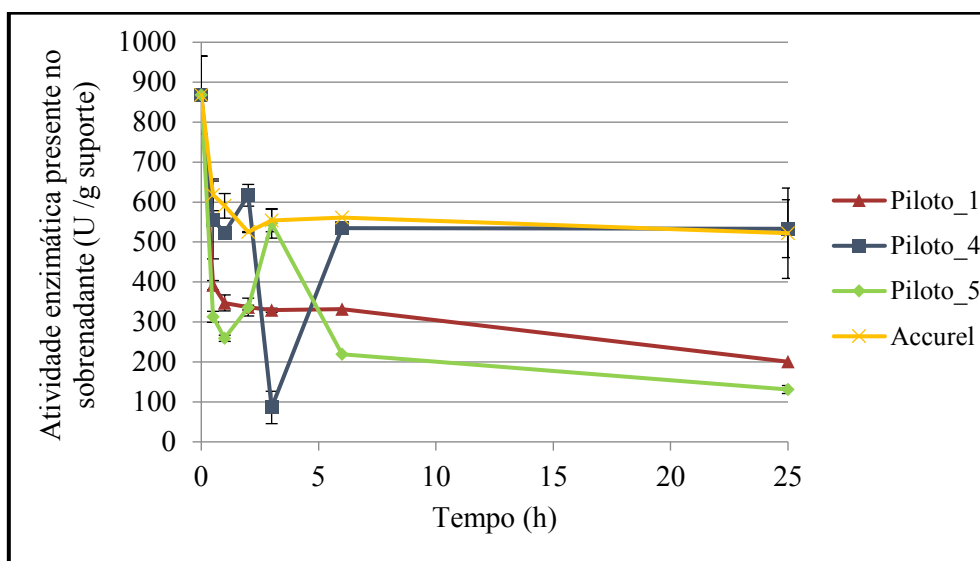
**Figura 60.** Atividade de esterificação das enzimas imobilizadas considerando o primeiro e segundo blocos de reações.

Dessa forma, é possível notar que foi possível sintetizar biocatalisadores extremamente ativos com as condições de imobilização selecionadas e utilizando o suporte com maiores área específica e porosidade do processo de imobilização. Vale salientar que aparentemente a saturação do suporte pela enzima estudada ainda não foi atingida, o que incentiva um aumento ainda maior da carga enzimática e indica que biocatalisadores casca-núcleo ainda mais ativos poderão ser produzidos.

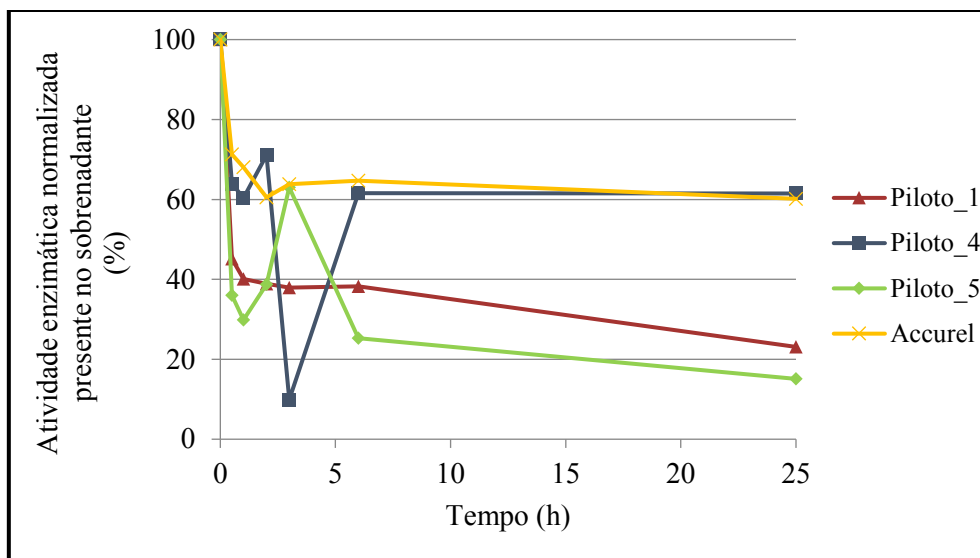
### ***3.3.3. Avaliação dos Suportes Produzidos em Escala Piloto na Síntese de Biocatalisadores***

Nesta seção foram empregados os suportes produzidos em larga escala no processo de imobilização da lipase CAL-B. Como mencionado, foram selecionados os suportes que apresentaram composições distintas. Foram empregados também o suporte comercial, Accurel, e o biocatalisador comercial, *Novozym 435*, para comparar e avaliar o desempenho dos suportes produzidos a partir da polimerização em suspensão e emulsão simultâneas. Na Figura 61 são observadas as cinéticas de imobilização para cada uma das imobilizações realizadas. A Figura 61A baseia-se nos valores absolutos de atividade

hidrolítica, enquanto na Figura 61B os valores foram normalizados pela atividade enzimática inicial presente no sobrenadante.



(A)



(B)

**Figura 61.** Análise cinética das imobilizações realizadas baseando-se na atividade de hidrólise durante o período de imobilização: **(A)** Valores Absolutos ( $U/g_{\text{suporte}}$ ); **(B)** Valores normalizados pela atividade enzimática inicial.

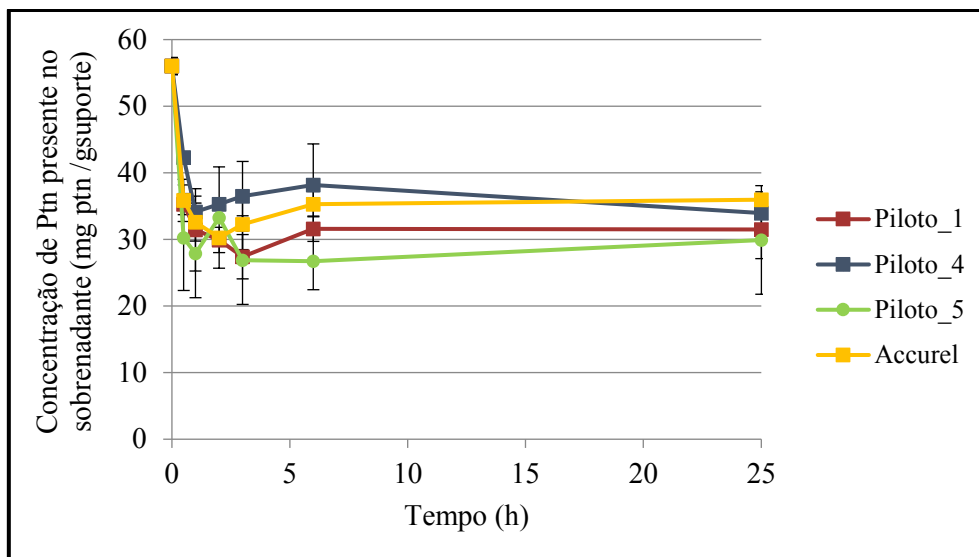
Ao observar as Figuras 61A e 61B, é possível notar que os suportes que mais adsorvem a lipase são Piloto\_1 (PMMA/PMMA) e Piloto\_5 (P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)) (aproximadamente 80% da carga enzimática inicial). Contudo, ambos os suportes

apresentaram áreas específicas e porosidades distintas e composições também diferentes. Dessa forma, uma análise mais aprofundada será realizada ao longo desta seção, de maneira a identificar quais propriedades mais afetam o processo de imobilização.

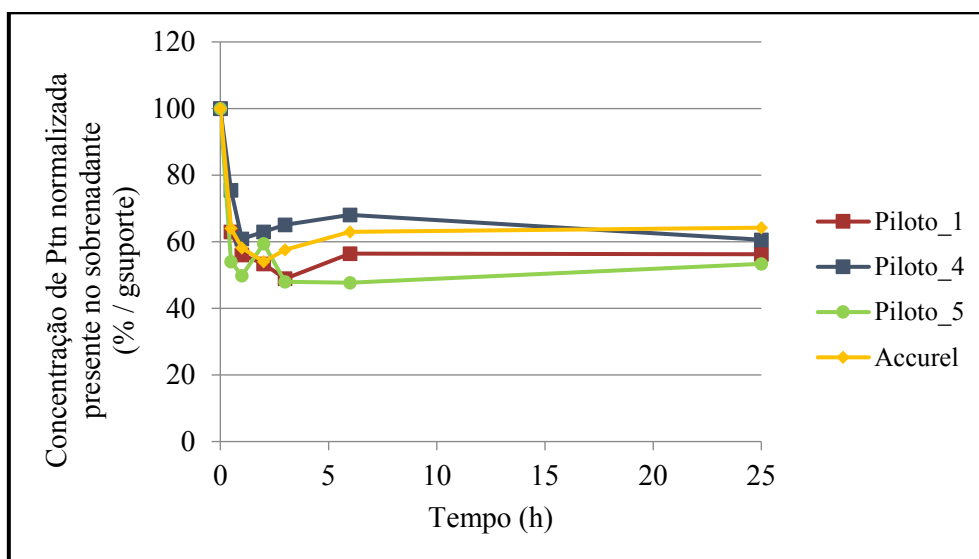
Nota-se também que o suporte comercial Accurel adsorveu uma quantidade de enzima similar ao suporte Piloto\_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)) (40% da carga enzimática inicial). Apesar de ambos apresentarem composições distintas, os dois suportes possuem áreas específicas similares, possibilitando adsorção de cargas enzimáticas semelhantes. Vale ressaltar que dois *outliers* foram detectados (os resultados de 3h para as imobilizações Piloto\_5 e Piloto\_4), mas ambos não comprometeram a análise cinética realizada.

O acompanhamento da quantidade de proteína presente no sobrenadante ao longo das imobilizações também foi realizado. Os resultados obtidos são mostrados nas Figuras 62A e 62B. Pode-se observar que todos os suportes adsorveram cargas proteicas semelhantes (aproximadamente 40% da concentração inicial de proteína). Os resultados encontrados anteriormente de baixa adsorção enzimática para os suportes Piloto\_4 e Accurel foram corroborados pelos resultados de baixa adsorção proteica. Contudo, os suportes Piloto\_1 e Piloto\_5, que apresentaram elevada adsorção de enzima, exibiram baixa adsorção proteica, o que pode indicar a adsorção preferencial da lipase estudada, em função da metodologia de imobilização empregada e das características de superfície dos suportes utilizados.

Os diferentes parâmetros de imobilização obtidos para cada uma das imobilizações realizadas são apresentados na Tabela 23. Os suportes que apresentaram maiores rendimentos de imobilização foram os suportes Piloto\_1 e Piloto\_5, apesar da concentração de proteína retida no suporte ter sido semelhante à dos demais. Como mencionado anteriormente, esse resultado indica a possível adsorção preferencial de lipase estudada aos suportes destacados.



(A)



(B)

**Figura 62.** Análise cinética das imobilizações realizadas baseada na quantidade de proteína ainda presente no sobrenadante ao longo da imobilização: **(A)** Valores Absolutos ( $\text{mg}_{\text{ptn}}/\text{gsuporte}$ ); **(B)** Valores normalizados pela concentração proteica inicial.

Na Tabela 20, nota-se também que o suporte Piloto\_4, apesar de apresentar o menor rendimento de imobilização, exibiu a maior retenção de atividade. Provavelmente esse comportamento possa ser explicado pela maior exposição das enzimas aos substratos, uma vez que todas as enzimas adsorvidas podem estar localizadas na superfície mais externa da partícula, sendo minimizados de forma substancial os efeitos difusivos de substratos e produtos, resultando em suporte com uma retenção de atividade



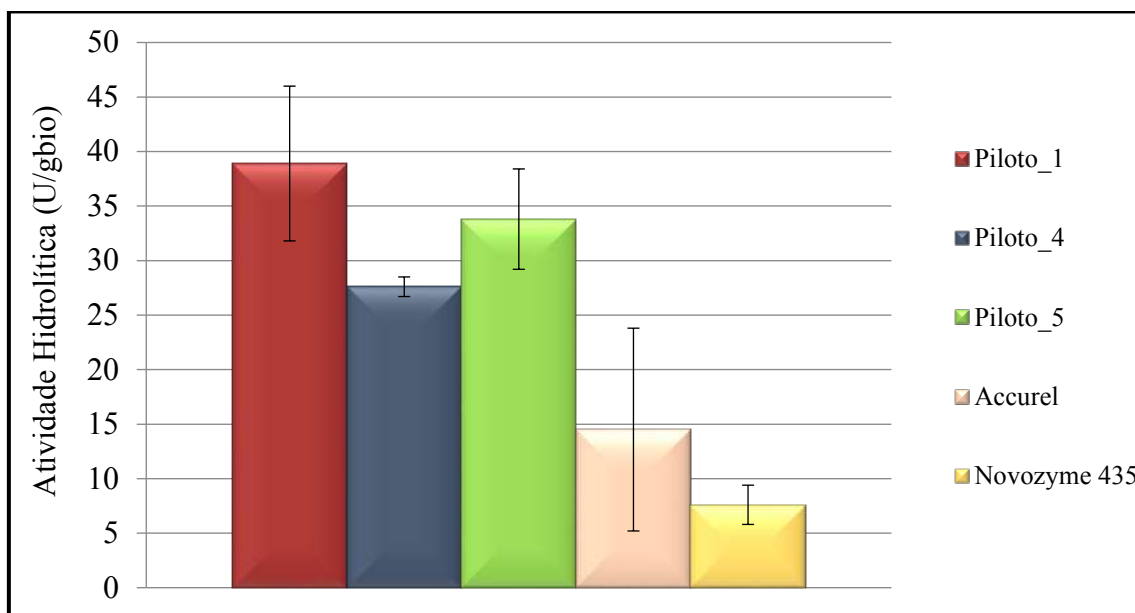
mais pronunciada. É possível observar também que, apesar das baixas área específica e porosidade apresentadas pelo suporte (Piloto\_5), o rendimento de imobilização nesse suporte foi elevado. Esse comportamento reforça a hipótese de que não é apenas a área específica dos suportes que afeta o rendimento de imobilização, mas também a composição química dos mesmos.

Como mencionado anteriormente, o diâmetro médio de poro dos suportes utilizados no processo de imobilização deve sempre ser analisado, de forma a avaliar se ele permite o acesso da enzima para a região mais interna da casca polimérica. Assim, como as partículas poliméricas produzidas apresentaram diâmetro médio de poro em torno de 200 Å, percebe-se que os poros são largos o suficiente para permitir o acesso da enzima para a região mais interna da casca do suporte, uma vez que esse diâmetro médio é muito superior ao tamanho da enzima estudada (caso sejam consideradas esferas, apresentam diâmetros na faixa de 50 a 70 Å (MOJOVIC *et al.*, 1998)). Dessa forma, parece pertinente afirmar que esta característica morfológica dos suportes não deve afetar o processo de imobilização das lipases nem a difusão de substratos e produtos; portanto, não devendo afetar as atividades dos biocatalisadores produzidos.

O desempenho dos diferentes biocatalisadores produzidos também foi avaliado. Na Figura 63 são mostradas as atividades hidrolíticas de cada um desses biocatalisadores. É possível notar que todos os biocatalisadores produzidos foram mais ativos que o biocatalisador produzido a partir do suporte comercial e mais ativos que o biocatalisador comercial. Além disso, apesar dos suportes apresentarem composições distintas e diferentes área específicas e porosidades, todos exibiram atividades hidrolíticas próximas. Muito provavelmente os efeitos de limitação difusional presentes nessas reações de hidrólise afetem e dificultem a observação de comportamentos diferenciados a depender do biocatalisador empregado.

**Tabela 20.** Parâmetros obtidos para as diferentes imobilizações empregando-se os suportes produzidos em larga escala.

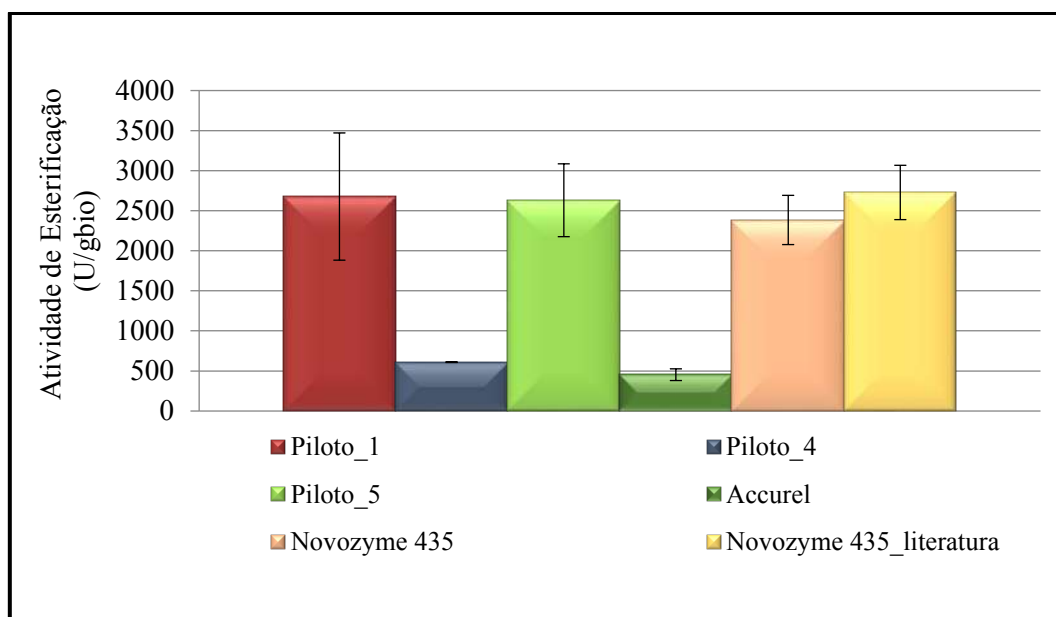
Legenda	Uentrada (U/gsuporte)	Uteórico (U/gsuporte)	Rendimento de Imobilização (%)	Retenção de Atividade Hidrolítica (%)	Conc. Ptn inicial (mg/gsuporte)	Conc. Ptn retida no suporte (mg/gsuporte)	Atividade de Hidrólise Biocatalisador (U/gbio)	Atividade de Esterificação Biocatalisador (U/gbio)
Piloto_1 (PMMA/PMMA)	867,9 ± 97,6	667,4	76,9	5,8	56,0 ± 1,3	24,5	38,9 ± 7,1	2676,8 ± 793,8
Piloto_4 (P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB))	867,9 ± 97,6	334,4	38,5	8,3	56,0 ± 1,3	22,1	27,6 ± 0,9	609,7 ± 3,4
Piloto_5 (P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB))	867,9 ± 97,6	736,9	84,9	4,6	56,0 ± 1,3	26,1	33,8 ± 4,6	2630,9 ± 454,6
Accurel	867,9 ± 97,6	345,8	39,8	4,2	56,0 ± 1,3	20,1	14,5 ± 9,3	453,4 ± 73
<i>Novozym 435</i>	-	-	-	-	-	-	7,6 ± 1,8	2384,7 ± 307,2



**Figura 63.** Atividade de hidrólise dos diferentes biocatalisadores produzidos, empregando-se os suportes sintetizados em larga escala.

As atividades de esterificação dos biocatalisadores produzidos são mostradas na Figura 64. Nota-se que os biocatalisadores mais ativos foram obtidos quando os suportes (Piloto\_1) e (Piloto\_5) foram empregados, sendo eles também os que apresentaram maiores rendimentos de imobilização. Ao comparar tais resultados com a atividade exibida pela *Novozym 435*, percebe-se que os biocatalisadores produzidos se mostraram tão ativos quanto o biocatalisador comercial. Esse resultado incentiva um estudo de saturação dos suportes produzidos, uma vez que, assim como foi mostrado na seção anterior, é possível que ao aumentar a carga enzimática inicial, biocatalisadores ainda mais ativos possam ser produzidos.

Vale destacar também que o suporte (Piloto\_5), apesar de apresentar área específica e porosidade baixas, exibiu uma atividade de esterificação elevada. Esse comportamento reforça a hipótese de que não é apenas a área específica que afeta a atividade dos biocatalisadores, mas também a composição química dos suportes empregados.



**Figura 64.** Atividade de esterificação dos diferentes biocatalisadores sintetizados, empregando-se os suportes sintetizados em larga escala.

São apresentadas na Tabela 21 as atividades de hidrólise e de esterificação dos biocatalisadores produzidos normalizadas pela área específica dos suportes. Pode-se notar que o suporte mais hidrofóbico do grupo (P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)) sintetizado em escala piloto exibiu as maiores atividades de hidrólise e de esterificação por  $m^2$ , reforçando o mecanismo de ativação interfacial das lipases em superfícies mais hidrofóbicas, também observado em alguns estudos descritos anteriormente. No entanto, valores distintos foram obtidos para o suporte produzido em escala bancada. Provavelmente, a elevada área específica provoca a diminuição da intensidade desse fenômeno de superfície. Contudo, é importante pontuar que tal resultado deve ser mais profundamente investigado.

Em contrapartida, o suporte mais hidrofílico também exibiu elevada atividade de esterificação por  $m^2$ , evidenciando que, apesar do maior grau de hidrofilicidade, ainda assim os suportes poliméricos apresentaram composição química apropriada para a imobilização enzimática eficiente, resultando em biocatalisadores com atividades expressivas.

É importante pontuar também que todos biocatalisadores produzidos apresentaram atividades de hidrólise e de esterificação por unidade de área superiores ao do biocatalisador comercial. Esse resultado incentiva a exploração de novas estratégias de reação para a síntese de suportes poliméricos com áreas ainda mais elevadas.

**Tabela 21.** Atividades normalizadas dos biocatalisadores.

Legenda	Atividade de Hidrólise Normalizada (U/m <sup>2</sup> )	Atividade de Esterificação Normalizada (U/m <sup>2</sup> )	Ângulo de Contato (°)
Piloto_1: PMMA/PMMA	1.30	89.5	55,9 ± 0,1
Piloto_4: P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)	1.02	22.6	- <sup>1</sup>
Piloto_5: P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)	6.38	496.4	105,7 ± 0,8
Accurel	0.53	16.5	87,7 ± 2,1
<i>Novozym 435</i>	0.39	26.7	- <sup>2</sup>
Reação 16: P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)	0.68	69.4	107,7 ± 1,7

<sup>1</sup> O ângulo de contato da amostra Piloto 4 não pôde ser detectado, em função da baixa resistência mecânica das pastilhas produzidas;

<sup>2</sup> O grau de hidrofobicidade da *Novozym 435* não foi determinado, pois o biocatalisador já havia sido produzido e as características do suporte, muito provavelmente, já teriam sido alteradas com o processo de imobilização.

Vale destacar que, apesar de não ter sido avaliada neste trabalho a reutilização dos biocatalisadores produzidos, esta análise foi realizada em reações de síntese orgânica, reações de hidrólise e na resolução de derivados de *mio*-inositol (MANOEL *et al.*, 2016a; MANOEL *et al.*, 2016b). MANOEL *et al.* (2016b) observaram que os biocatalisadores sintetizados a partir das partículas casca-núcleo poderiam ser empregados em até 5 ciclos de reações sem haver diminuição da conversão. Tal desempenho foi igual ou superior ao encontrado para a enzima comercial *Novozym 435*.

É importante ressaltar também que, como mostrado no **Capítulo II**, os suportes produzidos que continham DVB em sua composição apresentaram-se estáveis quimicamente mesmo na presença de solventes como tetraidrofurano (THF) (solvente largamente empregado para solubilização de polímeros). Esse resultado estimula a ampliação de aplicações desses suportes para a síntese de diversos biocatalisadores a serem empregados em diferentes reações de síntese orgânica.

### 3.4. *Conclusões Parciais*

Com base nos resultados apresentados, fica evidente a eficácia da utilização de partículas com morfologia casca-núcleo no processo de imobilização enzimática, frente inclusive às nanopartículas de elevada área específica formadoras da casca polimérica. Os biocatalisadores produzidos a partir das partículas casca-núcleo produzidas em larga escala resultaram em biocatalisadores mais ativos (em reações de hidrólise) e tão ativos quanto (ao analisar as reações de esterificação) que o biocatalisador comercial. Além disso, ao empregar os suportes de maior área específica e aumentar a carga enzimática inicial, foi possível sintetizar biocatalisadores mais ativos ( $A_{hid} = 34,7 \pm 3,8$ ;  $A_{est} = 3564,6 \pm 581$ ) que o catalisador *Novozym 435* ( $A_{hid} = 7,6 \pm 1,8$ ;  $A_{est} = 2384,7 \pm 307,2$ ).

É importante destacar que este trabalho está inserido em um contexto mais amplo, uma vez que se objetiva empregar tais biocatalisadores enzimáticos não apenas nas reações descritas neste capítulo, mas em processos biocatalíticos diversos, como para a síntese de fármacos, biolubrificantes, biodiesel, ésteres de glicerol e ésteres aromáticos.

Com o objetivo de melhorar ainda mais o desempenho dos suportes poliméricos e produzir biocatalisadores ainda mais ativos, foi realizado um estudo de funcionalização das nanopartículas poliméricas formadoras da casca das partículas casca-núcleo, que interagem diretamente com as enzimas no processo de imobilização. Essa etapa do estudo será descrita no *Capítulo IV*.

# *Capítulo IV*

## **Funcionalização das Nanopartículas Poliméricas**

Com base em um amplo estudo da literatura, percebeu-se que poucos trabalhos vislumbram a funcionalização de materiais poliméricos voltados para a síntese de biocatalisadores. Dessa forma, a realização de parte desta pesquisa de doutorado no exterior (no laboratório *Polymer Chemistry Laboratory* da *Queen Mary University of London*) mostrou-se de fundamental importância, pois possibilitaria a realização de novos experimentos em um tema que ainda não havia sido abordado de forma sistemática no Brasil, envolvendo técnicas de funcionalização de materiais poliméricos para aplicações como biocatalisadores, pouco exploradas no país.

Dessa forma, esta etapa do trabalho englobou a síntese de diferentes matrizes poliméricas e a funcionalização das cadeias que constituem essas matrizes. Mais especificamente, esta etapa objetivou estudar a funcionalização das nanopartículas poliméricas formadoras da casca das partículas casca-núcleo, explorando as reações de *Click Chemistry*. Assim, por meio de processos de funcionalização, busca-se produzir e ampliar o potencial de aplicação dos suportes poliméricos, vislumbrando empregá-los no processo de imobilização enzimática.

O presente capítulo está subdividido em quatro Seções. Na Seção 4.1 é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre os principais trabalhos que descrevem a funcionalização de materiais e partículas poliméricas; sendo apontados também alguns conceitos e estudos que envolvem especificamente as reações de *Click Chemistry*. Em seguida, na Seção 4.2, são apresentadas as metodologias e os principais resultados envolvendo a funcionalização das matrizes poliméricas. Na Seção 4.3 é dado maior enfoque às estratégias e metodologias de funcionalização das nanopartículas poliméricas, sendo que os principais resultados obtidos nesta etapa também são apresentados. As conclusões parciais obtidas são apresentadas na Seção 4.4. O emprego das nanopartículas no processo de imobilização enzimática, infelizmente, não será mostrado no presente trabalho. Esta etapa do trabalho continua em andamento.

#### 4.1. Revisão Bibliográfica

Como mencionado anteriormente, houve grande expansão da aplicação das enzimas em diferentes processos industriais nos últimos anos. Nesse contexto, diferentes processos de síntese de materiais poliméricos, que apresentem propriedades específicas para interagir de maneira particular com essas proteínas, têm sido desenvolvidos, destacando-se também o aprimoramento de novas técnicas de funcionalização desses polímeros.

A funcionalização de suportes poliméricos objetiva adicionar grupamentos funcionais de interesse na superfície desses materiais, possibilitando a síntese de resinas, incluindo polímeros *commodities*, com propriedades ainda mais diferenciadas. Segundo a definição da IUPAC (União Internacional de Química Pura e Aplicada), a funcionalização de um material engloba a introdução de grupamentos químicos em sua estrutura, de forma a gerar propriedades químicas, físicas, biológica ou farmacológicas específicas (HORIE *et al.*, 2007). Assim, diversas estruturas poliméricas podem ser sintetizadas, novas superfícies e interfaces podem ser produzidas e novos materiais são gerados. Vale ressaltar que os processos de funcionalização ampliam a versatilidade dos materiais poliméricos, resultando em polímeros que, muitas vezes, não poderiam ser produzidos por processos clássicos de polimerização (IHA *et al.*, 2009; SANCHEZ-SANCHEZ *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; JO e THEATO, 2015).

É importante destacar que o processo de funcionalização pode ocorrer por diferentes rotas químicas. Há a possibilidade da reação de funcionalização acontecer durante o processo de polimerização (funcionalização *in-situ*), envolvendo uma única etapa reacional. É possível também que haja, primeiramente, a funcionalização do monômero de interesse e, em uma etapa posterior, a polimerização de tal composto. No entanto, a maior parte dos estudos propõe realizar a etapa de funcionalização após a síntese do material polimérico. Nesse contexto, dentre as inúmeras reações possíveis, destacam-se as reações de adição tiol-eno, reações de abertura de anel epóxido, adição de Michael e as reações de ciclo adição de alcino-azida catalisada por Cu (IHA *et al.*, 2009; SANCHEZ-SANCHEZ *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; JO e THEATO, 2015).

Ao analisar a literatura técnico-científica, percebe-se que diversos estudos de funcionalização são descritos envolvendo polimerizações em massa ou solução (McEWAN *et al.*, 2013; BRUMMELHUIS e WECK, 2014). No entanto, há redução



significativa no número de pesquisas realizadas na área de síntese de partículas funcionalizadas. Mais escassos ainda são os trabalhos que descrevem processos de funcionalização durante o processo de polimerização (funcionalização *in situ*). Como mencionado anteriormente, a etapa de funcionalização geralmente é descrita após a produção do material polimérico (funcionalização pós-polimerização). É importante destacar que diferentes monômeros podem ser empregados na funcionalização dos materiais poliméricos, atuando eles próprios como compostos funcionais ou servindo de intermediários para reações de funcionalização subsequentes, destacando-se os monômeros do tipo epóxido ou monômeros contendo grupamentos flúor (IHA *et al.*, 2009; SANCHEZ-SANCHEZ *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2014; JO e THEATO, 2015). Dessa forma, no presente trabalho é estudada a incorporação dos comonômeros metacrilato de glicidila e pentafluoroestireno às cadeias poliméricas de poli(estireno-co-divinilbenzeno), atuando eles próprios como compostos funcionais (uma vez que contém anel epóxido e átomos de flúor pendentes, respectivamente) e como comonômeros reativos, intermediários para novas reações de funcionalização subsequentes.

O emprego do monômero funcional metacrilato de glicidila é amplamente descrito na literatura, uma vez que este composto contém em sua estrutura um anel epóxido, grupo funcional bastante versátil (ZENG *et al.*, 2004; NORAKANKORN *et al.*, 2009; FAN *et al.*, 2013). Esse anel, por reações subsequentes, pode ser aberto, havendo a introdução de novos grupamentos químicos na cadeia; ou pode ainda interagir diretamente com a estrutura da enzima por ligação de caráter covalente (HOMAEI *et al.*, 2013). Apesar dessa versatilidade, muitos estudos concentram-se apenas na síntese das nanopartículas poliméricas, sem mencionar etapas de funcionalização propriamente ditas.

ZENG *et al.* (2004), por exemplo, estudaram a produção de nanopartículas à base de metacrilato de glicidila por um processo de emulsão, buscando sintetizar partículas com morfologia específica. NORAKANKORN *et al.* (2009) descreveram a produção de nanopartículas em emulsão à base de um copolímero de metacrilato de glicidila, apresentando estrutura casca-núcleo. Já FAN *et al.* (2013) estudaram a síntese de nanopartículas em emulsão, buscando incorporar às partículas poliméricas nanopartículas de sílica. No entanto, em nenhum dos estudos apresentados foi descrita a realização de reações de funcionalização.

Os polímeros à base de flúor também são largamente descritos na literatura, uma vez que apresentam elevado grau de hidrofobicidade, sendo muito empregados no

recobrimento de superfícies. Contudo, muitos estudos são conduzidos com o objetivo de inserir grupamentos fluorados à cadeia polimérica principal ou às cadeias laterais de um polímero já produzido. As pesquisas que envolvem a polimerização de comonômeros de flúor, como pentafluoroestireno (PFS), e focam na funcionalização das correspondentes partículas são escassas (MISRA *et al.*, 2009; LEI *et al.*, 2015; WANG e WANG, 2015).

MISRA *et al.* (2009), por exemplo, produziram nanopartículas em emulsão à base de PFS, objetivando sintetizar filmes poliméricos. LEI *et al.* (2015) estudaram a síntese de copolímeros à base de PFS, para a síntese de microgéis. WANG e WANG (2015) estudaram a síntese de nanopartículas em emulsão com o uso de sementes para síntese de filmes poliméricos hidrofóbicos. No estudo, foi introduzido um comonômero à base de flúor (*methylacryloyloxyl-2-hydroxypropyl perfluorooctanate (FGOA)*) para a síntese de uma espécie de filme ao redor das sementes poliméricas. Em nenhum dos estudos mencionados foram descritas as etapas de funcionalização.

Dessa forma, apesar de alguns estudos envolverem a síntese de nanopartículas poliméricas à base de metacrilato de glicidila e pentafluoroestireno, um número mais reduzido estuda a funcionalização propriamente dita de tais materiais. O emprego de reações de *Click Chemistry* tem se destacado nesse contexto como possível rota de funcionalização dessas resinas poliméricas. Esta técnica será detalhada a seguir.

#### **4.1.1. Click Chemistry**

A técnica de *Click Chemistry* foi descrita primeiramente por KOLB *et al.* em 2001. Ela engloba uma série de reações químicas que devem apresentar algumas características: ser modular; possuir elevado rendimento; gerar compostos intermediários atóxicos; ser regioseletiva (não necessariamente enantiosseletiva); as condições de reação devem ser simples (idealmente, o processo não deve sofrer influência de oxigênio e água); idealmente, os materiais e reagentes devem estar facilmente disponíveis; o uso de solventes deve ser evitado, com exceção de água ou de componentes que possam ser removidos facilmente; resultar em produto de fácil separação; o processo de purificação, se requerido, deve ser não cromatográfico, como destilação e cristalização; o produto deve ser estável nas condições fisiológicas. Esses processos são rápidos e, geralmente, tendem a ser específicos para a produção de um determinado produto (KOLB *et al.*, 2001). De forma mais sucinta, as reações de *Click Chemistry* em geral apresentam elevado

rendimento, são simples, rápidas, ocorrem sob condições brandas de reação, sem gerar subprodutos tóxicos e, geralmente, tendem a ser específicas para a produção de um determinado produto (BECER *et al.*, 2009; KOLB *et al.*, 2011; GOKMEN e DU PREZ, 2012).

As classes de transformações químicas que se enquadram na definição de *Click Chemistry* mais comuns são: reações de cicloadição de espécies insaturadas; reações de abertura de anéis nucleofílicos, como grupos epóxidos; química de carbonilação não aldólica; adição de múltiplas ligações carbono-carbono, especialmente adição oxidativa (KOLB *et al.*, 2001; MOSES e MOORHOUSE, 2007; IHA *et al.*, 2009; SANCHEZ-SANCHEZ *et al.*, 2013). As reações de substituição nucleofílica envolvendo átomos de flúor e grupamentos tiol também se encaixam em tal definição (BECER *et al.*, 2009). Essa técnica tem sido recentemente empregada em processos de bioconjugação, no desenvolvimento de fármacos e na síntese e funcionalização de diferentes materiais poliméricos (JORALEMON *et al.*, 2005; MOSES e MOORHOUSE, 2007).

Especificamente em relação aos comonômeros anteriormente destacados (metacrilato de glicidila e pentafluoroestireno), alguns estudos de síntese orgânica têm sido descritos na literatura. Contudo, um número reduzido envolve a síntese das nanopartículas poliméricas e a funcionalização desses materiais. Alguns estudos realizados nessa área podem ser destacados. SONG *et al.* (2011), por exemplo, estudaram a síntese de nanopartículas casca-núcleo funcionalizadas. Inicialmente sintetizaram núcleos poliméricos a partir da copolimerização de estireno, divinilbenzeno e metacrilato de glicidila. Em uma etapa subsequente, diferentes grupamentos funcionais foram introduzidos à superfície das partículas por meio de diferentes reações do tipo *Click Chemistry*, que exploravam a presença do grupamento epóxido do metacrilato de glicidila. Tais partículas funcionalizadas foram empregadas com sucesso para adsorção de corantes orgânicos.

ATANASOV *et al.* (2013) estudaram a síntese de nanopartículas de polipentafluoroestireno em emulsão. Um estudo subsequente de funcionalização das nanopartículas para introdução de grupamentos ácido sulfônicos às cadeias de PFS foi conduzido. BECER *et al.* (2009), por exemplo, estudaram a síntese de nanopartículas à base de pentafluoroestireno a partir de um procedimento de polimerização em solução, seguido por nanoprecipitação. Tais partículas foram funcionalizadas a partir de reações

do tipo *Click* entre às unidades reativas do PFS e um composto funcional à base de tiol-glicose, sendo produzidos ao final do processo os chamados glicopolímeros.

Dessa forma, é possível perceber que a funcionalização de partículas poliméricas a partir da técnica de *Click Chemistry* é viável e que muitos avanços podem ser realizados nessa área. Apesar das inúmeras vantagens que as técnicas de funcionalização apresentam na síntese de materiais, os trabalhos descritos na literatura estão concentrados em um grupo seleto de pesquisadores estrangeiros, reforçando a necessidade de desenvolver pesquisas de funcionalização e de síntese de novos materiais poliméricos também no Brasil.

#### **4.1.2. Comentários Finais**

Por tudo o que foi apresentado, percebe-se que poucos trabalhos visam à síntese de nanopartículas em emulsão, à base de metacrilato de glicidila e à base de pentafluoroestireno. São ainda mais reduzidos estudos subsequentes de funcionalização desses materiais. O emprego da técnica de *Click Chemistry* também foi pouco explorado na síntese de biocatalisadores. Sabe-se também que o emprego do GMA e PFS em reações de copolimerização com estireno e divinilbenzeno não são inovadores. No entanto, não foi encontrado até o momento qualquer estudo que utilizasse a metodologia que será descrita, que empregasse os compostos funcionais usados e que avaliasse a metodologia mais apropriada de funcionalização das nanopartículas poliméricas. Ao considerar o processo de polimerização por suspensão e emulsão simultâneas, nenhum estudo de síntese das nanopartículas formadoras da casca contendo GMA ou PFS foi realizado, tampouco de funcionalização dessas partículas casca-núcleo.

Diante do exposto, o presente trabalho visou a estudar inicialmente a funcionalização das matrizes poliméricas. Para isso, foi empregado como monômero estireno e foi avaliada a inserção de diferentes teores de metacrilato de glicidila e pentafluoroestireno, a depender da reação. Dessa forma, nesta primeira etapa buscou-se avaliar se as condições operacionais de polimerização adotadas seriam adequadas para uma incorporação eficiente dos comonômeros GMA e PFS às cadeias poliméricas de poliestireno. Vale ressaltar que ambos os comonômeros foram considerados compostos funcionais (uma vez que o GMA contém anel epóxido e o PFS contém átomos de flúor pendentes) e ambos também foram empregados como intermediários para reações de

funcionalização subsequentes. As reações de funcionalização envolveram a inserção de grupamentos de interesse do tipo amina e tiol às cadeias poliméricas, explorando as reações *Click Chemistry*.

Na etapa seguinte, optou-se por focar na síntese e funcionalização das nanopartículas poliméricas formadoras da casca porosa, ao invés de estudar a complexa síntese e funcionalização das partículas com morfologia casca-núcleo. Foram estudadas, então, duas estratégias para funcionalização das nanopartículas produzidas em emulsão: a funcionalização pós-polimerização e a funcionalização *in-situ*. Dessa forma, buscou-se obter diferentes suportes, apresentando funcionalidades distintas, capazes de interagir de maneiras diferentes com enzimas.

## **4.2. Funcionalização das Matrizes Poliméricas**

Esta seção visa a descrever tanto os materiais quanto a metodologia adotada durante as reações de copolimerização em solução das diferentes resinas poliméricas contendo os compostos epóxido e fluorados. As etapas de purificação e de funcionalização de tais materiais também são descritas. As técnicas utilizadas para a caracterização dos polímeros produzidos que não foram descritas no **Capítulo II** são apresentadas também na presente seção.

### **4.2.1. Materiais e Metodologias**

Como mencionado anteriormente, inicialmente foi estudada a incorporação dos monômeros funcionais, metacrilato de glicidila ou pentafluoroestireno, às cadeias de poliestireno. Vale salientar que novamente todos os reagentes foram utilizados como recebido, sem haver qualquer etapa intermediária de purificação. Nesta primeira etapa, foram utilizados como comonômeros o estireno, o metacrilato de glicidila e o pentafluoroestireno. Todos os monômeros foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (UK) com pureza mínima de 99%. O iniciador, peróxido de benzoíla, também foi fornecido pela Sigma-Aldrich (UK), com teor máximo de umidade de 25%. Como solvente foi utilizado tolueno com grau HPLC fornecido pela Sigma-Aldrich (UK).

Na etapa de funcionalização, foram empregados como compostos funcionais benzilamina, dodecilamina e tiofenol. Todos esses compostos também foram fornecidos

pela Sigma-Aldrich (UK) com pureza mínima de 99%. A trietilamina, empregada como catalisador, foi fornecida pela Sigma-Aldrich (UK) com pureza mínima de 99%.

É importante ressaltar que alguns reagentes também foram empregados durante a etapa de caracterização. Assim, para realização das análises de cromatografia gasosa (GC) foi utilizada acetona com pureza mínima de 99% fornecida pela VWR International. O tetrahidrofurano (THF) e a dimetilformamida (DMF), ambos grau HPLC, foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (UK) e foram empregados nas análises de GPC, tanto como fase móvel quanto para solubilizar as amostras poliméricas. Para realizar as análises de ressonância magnética nuclear (RMN), foi utilizado clorofórmio deuterado fornecido pela Sigma-Aldrich (UK) para solubilizar os materiais poliméricos produzidos.

Esta etapa do trabalho foi subdividida em três grupos de reações: um bloco de reações envolvendo a incorporação do metacrilato de glicidila como comonômero funcional; um grupo de reações englobando a adição de pentafluoroestireno, também como comonômero funcional; e a terceira etapa envolvendo a funcionalização das cadeias poliméricas produzidas.

As condições operacionais empregadas para síntese das soluções poliméricas foram determinadas de forma a aproximar as novas reações realizadas àquelas desenvolvidas e descritas no **Capítulo II**. Dessa forma, em todas as reações de polimerização em solução, utilizou-se tolueno (70% m/m em relação à massa total) como solvente; mistura de comonômeros (30% m/m em relação à massa total); e peróxido de benzoíla, como iniciador (2% m/m em relação à massa monomérica). As reações eram conduzidas em balão volumétrico por 20 h a 90 °C. A massa total do meio reacional foi de 50 g.

As reações em que metacrilato de glicidila foi adicionado ao meio reacional foram conduzidas em sistema aberto, acoplado-se um condensador ao sistema, de forma a evitar a perda de reagentes. Já nas reações em que pentafluoroestireno foi empregado como composto funcional, em função da alta pressão de vapor deste composto nas condições de reação, o sistema foi mantido fechado e selado ao longo de toda polimerização. Vale destacar que argônio foi borbulhado por 10 min no início de cada reação, de forma a remover o oxigênio ainda presente no meio reacional. As reações realizadas nesta etapa do trabalho são apresentadas nas Tabelas 22 e 23. É importante mencionar que as percentagens mostradas correspondem aos teores mássicos de cada comonômero em relação à massa monomérica total.

**Tabela 22.** Reações realizadas no primeiro bloco de experimentos.

Reações	Legenda
Reação 06	PS
Reação 07	P(S-co-GMA) (10%GMA)
Reação 08	P(S-co-GMA) (20%GMA)
Reação 05	P(S-co-GMA) (50%GMA)
Reação 17	P(S-co-GMA) (50%GMA)
Reação 15	PGMA

**Tabela 23.** Reações realizadas no segundo bloco de experimentos.

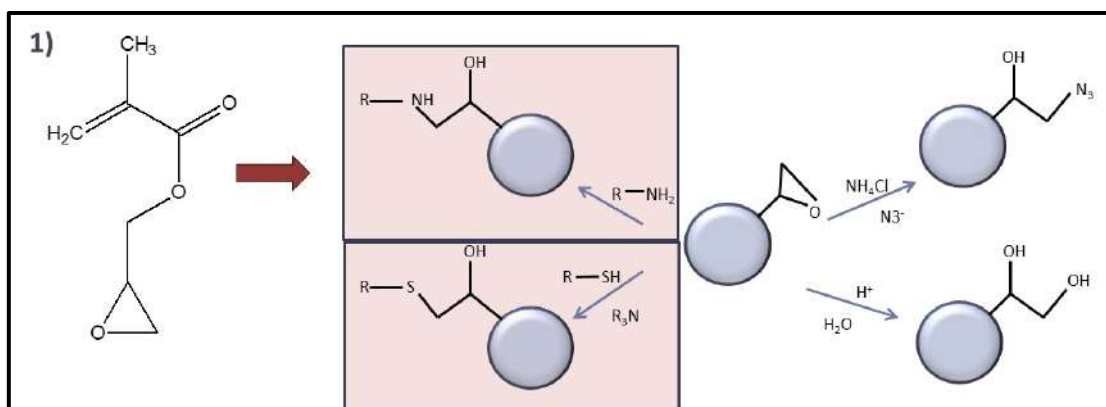
Reações	Legenda
Reação 10	PS
Reação 11	P(S-co-PFS) (10%PFS)
Reação 13	P(S-co-PFS) (20%PFS)
Reação 12	P(S-co-PFS) (50%PFS)
Reação 18	P(S-co-PFS) (50%PFS)

Após o término da cada reação, os materiais produzidos foram submetidos a duas etapas de purificação. Para isso, as soluções poliméricas foram gotejadas em metanol, havendo a precipitação das cadeias de polímero e a formação de partículas. Tais partículas foram, então, ressolubilizadas em tolueno e novamente precipitadas em metanol. Dessa forma, almejou-se obter materiais poliméricos sem a presença de monômeros residuais e solvente. Os materiais submetidos a duas etapas de purificação foram identificados com as letras “pp” após a legenda.

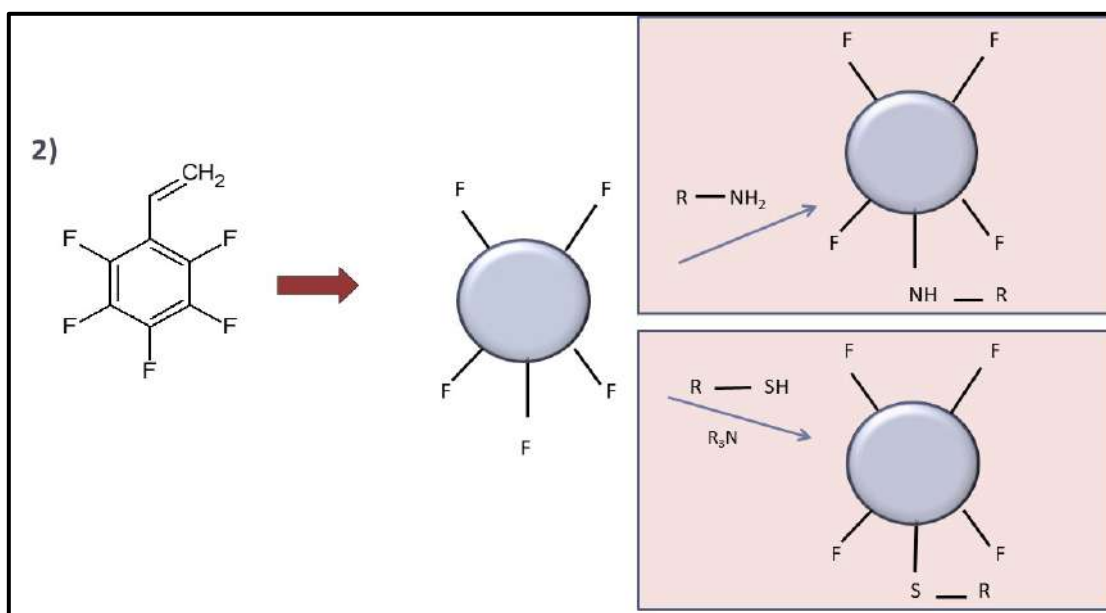
A etapa subsequente às polimerizações englobou as reações de funcionalização, em meio homogêneo, das cadeias poliméricas produzidas nos primeiro e segundo blocos de experimentos. Assim, após a purificação de tais materiais poliméricos, eles foram novamente solubilizados em tolueno (0,5 g de polímero em 5 mL de tolueno) e a essa solução foram adicionados os compostos funcionais em excesso. Nesta etapa foi explorada a técnica de funcionalização pós-polimerização, sendo empregados como compostos funcionais aminas (benzilamina e dodecilamina) e tióis (tiofenol). Empregou-se também como catalisador a trietilamina (TEA) na proporção molar (1 mol grupo

funcional presente no polímero : 5 mols composto funcional : 3 mols TEA). As reações foram conduzidas em *Schlenk* a 60 °C em sistema fechado por 24 h sob atmosfera inerte de argônio.

Na Figura 65 são apresentadas as reações de funcionalização por *Click Chemistry*, empregando-se os diferentes grupamentos funcionais (amina e tiol), sendo explorada a abertura do anel epóxido presente nos copolímeros à base de metacrilato de glicidila. As reações do tipo *Click* que ocorrem entre os átomos de flúor do pentafluoroestireno e os grupamentos funcionais (amina e tiol) são mostradas na Figura 66.



**Figura 65.** Utilização do metacrilato de glicidila em diferentes tipos de reações de funcionalização de *Click Chemistry*, destacando-se as reações com aminas e tióis, como compostos funcionais (*Adaptado de GOKMEN e DU PREZ, 2012*).



**Figura 66.** Uso do pentafluoroestireno em reações de funcionalização do tipo *Click Chemistry* (usando-se tióis e aminas).



A seleção da benzilamina e da dodecilamina como compostos funcionais é justificada pela presença de grupamentos hidrofóbicos em suas estruturas (anel aromático e longa cadeia carbônica respectivamente), além da possibilidade dos materiais produzidos interagirem com as enzimas a serem imobilizadas por ligações de caráter covalente, em função dos grupamentos amina inseridos às cadeias poliméricas. Já o tiofenol, por ser um composto funcional reativo que contém grupamento tiol, também possibilita a inserção de grupamentos potencialmente hidrofóbicos nas cadeias poliméricas, podendo promover a ativação interfacial da lipase com o processo de imobilização.

Após a síntese dos diferentes materiais poliméricos, diversas análises foram realizadas com o objetivo de caracterizar tais resinas: microscopia óptica, cromatografia de permeação em gel (GPC), análises para determinação do grau de hidrofobicidade os materiais, cromatografia gasosa (GC) e ressonância magnética nuclear (RMN). Análises de conversão e de rendimento também foram conduzidas. Algumas técnicas de caracterização já foram descritas no *Capítulo II*. A seguir serão descritas apenas as técnicas que ainda não foram detalhadas: cromatografia gasosa (GC); ressonância magnética nuclear (RMN); cromatografia de permeação em gel (GPC) (para as reações deste Capítulo, outro equipamento de GPC foi utilizado).

#### ***4.2.1.1. Cromatografia Gasosa (GC)***

A técnica de cromatografia gasosa consiste em um processo de separação de uma mistura de compostos que são termicamente estáveis e voláteis. Dessa forma, uma amostra é inicialmente aquecida e volatilizada em um forno. Essa amostra volátil é injetada, então, em uma coluna, empregando um gás de arraste conhecido por gás auxiliar. À medida que o fluxo de gás atravessa a coluna, ele carrega os componentes da amostra, que interagem de formas distintas com a fase estacionária da coluna. Assim, cada composto é eluído em um tempo específico e exibe intensidades distintas (a depender de sua concentração na amostra), sendo detectados ao sair da coluna por meio de um detector.

Para determinar a conversão de cada um dos comonômeros nas diferentes reações de polimerização, foram realizadas análises de GC das amostras coletadas no início e ao fim de cada reação. Inicialmente, a cada amostra (2 gotas) eram adicionados (1,5 mL) de

acetona. Essa solução polimérica era, então, injetada em um cromatógrafo fabricado pela DANI Instruments, modelo Master GC, equipado com um detector de ionização de chama e uma coluna capilar Dani DN-WAX (comprimento de 30 m, diâmetro interno de 0,32 mm e espessura do filme de 1,0  $\mu\text{m}$ ). O forno operava a 220 °C, empregando como gás auxiliar nitrogênio (vazão de 1 mL/min).

Dessa forma, a partir da determinação dos picos característicos de cada componente e com base na razão entre as áreas individuais de cada um e do padrão interno (tolueno, solvente das reações, foi utilizado como padrão interno), foi possível quantificar cada componente presente em cada amostra.

#### **4.2.1.2. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Pode-se utilizar a técnica de ressonância magnética nuclear para determinar a estrutura de cadeias poliméricas. Esta técnica explora interações existentes entre um campo magnético estável e o momento magnético exibido por alguns núcleos (“spin” não nulo) (BRANDOLINI e HILLS, 2000; CANEVAROLO, 2004). Dessa forma, a depender das características estruturais da amostra, ela pode responder ao campo eletromagnético de maneira específica. O espectro de RMN é o registro dessas respostas. Os núcleos mais estudados são  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  em aparelhos com frequência de 200 e 300 Hz.

Para realizar as análises de RMN, cada amostra era previamente solubilizada em clorofórmio deuterado (2 - 2,2 mL). Os espectros de ressonância magnética nuclear de próton ( $^1\text{H}$  e  $^{19}\text{F}$ ) foram adquiridos em um equipamento Bruker AV-III 400 a 303 K em uma frequência de próton de 400.13 MHz.

As conversões de cada comonômero foram determinadas a partir da integral dos grupamentos vinílicos característicos de cada composto monomérico ( $\text{H}_2\text{C} = \text{CH}-$ ) ( $\approx 6,5$ - $5,5$  ppm) que tendem a diminuir ao longo da reação de polimerização (os picos correspondentes a cada monômero são destacados na seção de resultados). A partir dos espectros de RMN, foi possível analisar também a composição das cadeias poliméricas produzidas.

A comparação entre os espectros de RMN das resinas poliméricas obtidos antes e após as reações de funcionalização possibilitaram o cálculo da conversão de cada composto funcional. Inicialmente, os picos que seriam alterados durante as reações de funcionalização foram determinados (benzilamina:  $\approx 3,5$  ppm; dodecilamina:  $\approx 2,5 - 3,0$

ppm; tiofenol:  $\approx 7,3 - 7,5$  ppm). Assim, ao observar a diminuição relativa deste pico, foi calculada a conversão. Vale salientar que, como os compostos funcionais foram adicionados em excesso, para o cálculo da conversão foi relacionado o número de mols que reagiram de cada composto funcional e o número de mols de cada grupamento reativo (anél epóxido e *p*-flúor) presente na resina polimérica no início da etapa de funcionalização.

A conversão relativa dos grupamentos de F<sup>-</sup> foi determinada também observando-se os espectros de F<sup>19</sup> e a diminuição do pico correspondente ao *para*-F antes e após a reação de funcionalização. É sabido que apenas os átomos de flúor na posição *para*- estão sujeitos à substituição nucleofílica (BECER *et al.*, 2009).

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

Nesta etapa do trabalho, as análises de cromatografia de permeação de gel (GPC) foram conduzidas operando com tetrahydrofurano (THF) (para os materiais à base de GMA) e dimetilformamida (DMF) (para os materiais à base de PFS e para todas as matrizes funcionalizadas). O equipamento utilizado foi um Agilent 1260, equipado com um detector refratométrico. O equipamento operava com um amostrador automático e 2 colunas (2 PLgel 5  $\mu$ m (300  $\times$  7,5 mm); PLgel 5 mm (50x7.5mm), uma coluna de proteção). Os solventes THF e DMF foram empregados como fase móvel nas análises correspondentes. O instrumento foi calibrado utilizando padrões de poli(metacrilato de metila) (550 - 46890 Da). Todas as amostras foram previamente filtradas em membrana 0,2  $\mu$ m para remoção de possíveis contaminantes.

### **4.2.2. Resultados**

#### **4.2.2.1. Incorporação do GMA às Matrizes Poliméricas**

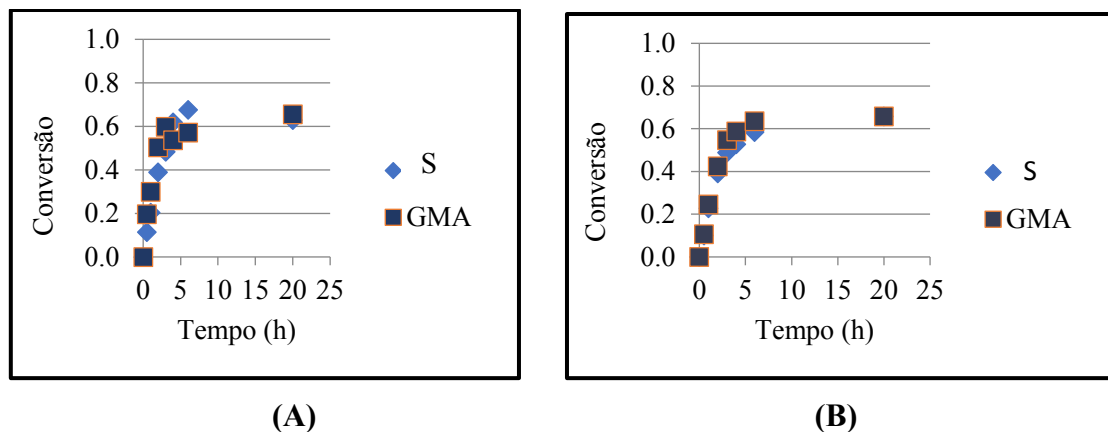
Como mencionado anteriormente, inicialmente, estudou-se a incorporação de monômeros do tipo epóxido (metacrilato de glicidila, GMA) às cadeias de poliestireno (PS). Para isso, foram empregadas concentrações crescentes de GMA no meio reacional (0; 10%; 20%; 50%; 100% m/m em relação à massa monomérica total).

A conversão de cada comonômero em cada uma das reações realizadas é apresentada na Tabela 24. As conversões foram determinadas por GC e RMN. É possível notar que os valores de conversão obtidos por ambas as técnicas foram semelhantes. Apenas nas reações em que baixo teor de GMA foi adicionado ao sistema (Reação 07 e Reação 08), observou-se uma discrepância nos valores de conversão obtidos para este comonômero. No entanto, em função da maior sensibilidade das análises de RMN, possivelmente as análises de GC não foram apropriadas para a detecção das baixas concentrações deste comonômero. Nota-se também que a conversão de estireno aumentou com o aumento do teor de metacrilato de glicidila no meio reacional, provavelmente em função da elevada reatividade do comonômero epóxido. É importante ressaltar que a reação de síntese de poli(metacrilato de glicidila) (PGMA) resultou em um produto final de elevada viscosidade, dificultando a análise do ponto final (possivelmente ocorreu a formação de material reticulado).

**Tabela 24.** Conversão de cada um dos monômeros em cada uma das reações realizadas.

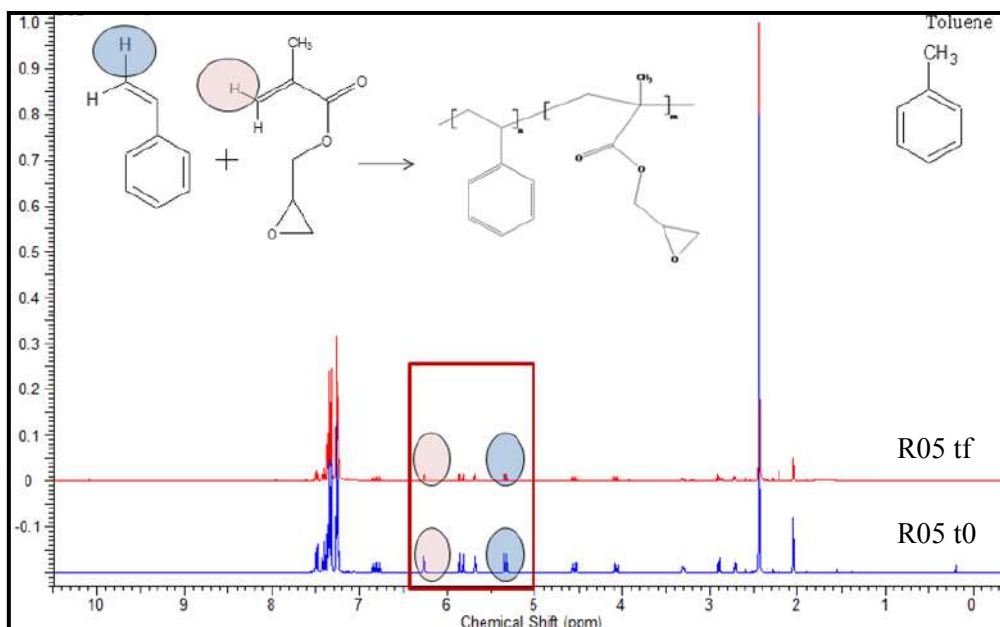
	Legenda	Conversão GC (%)		Conversão RMN (%)		Conversão Total GC (%)	Conversão Total RMN (%)
		S	GMA	S	GMA		
Reação 06	PS	54	-	54	-	54.4	54.4
Reação 07	P(S-co-GMA) (10%GMA)	53	2	56	74	47.9	57.7
Reação 08	P(S-co-GMA) (20%GMA)	51	27	56	67	46.1	58.0
Reação 05	P(S-co-GMA) (50%GMA)	66	56	64	60	61.0	62.0
Reação 17	P(S-co-GMA) (50%GMA)	66	63	66	66	64.3	65.7
Reação 15	PGMA	-	-	-	-	-	-

A conversão de cada um dos monômeros também foi avaliada ao longo do tempo de reação. Para tal estudo, a reação selecionada foi a reação em que as maiores concentrações de cada um dos monômeros foram adicionadas (Reação 17). Na Figura 67 é possível observar que as conversões de ambos os monômeros ao longo de toda a reação são muito próximas, indicando que ambos os monômeros são incorporados de forma aleatória com taxas similares nas cadeias poliméricas. Nota-se também que comportamentos similares foram obtidos a partir de ambas as técnicas de análise, GC e RMN.



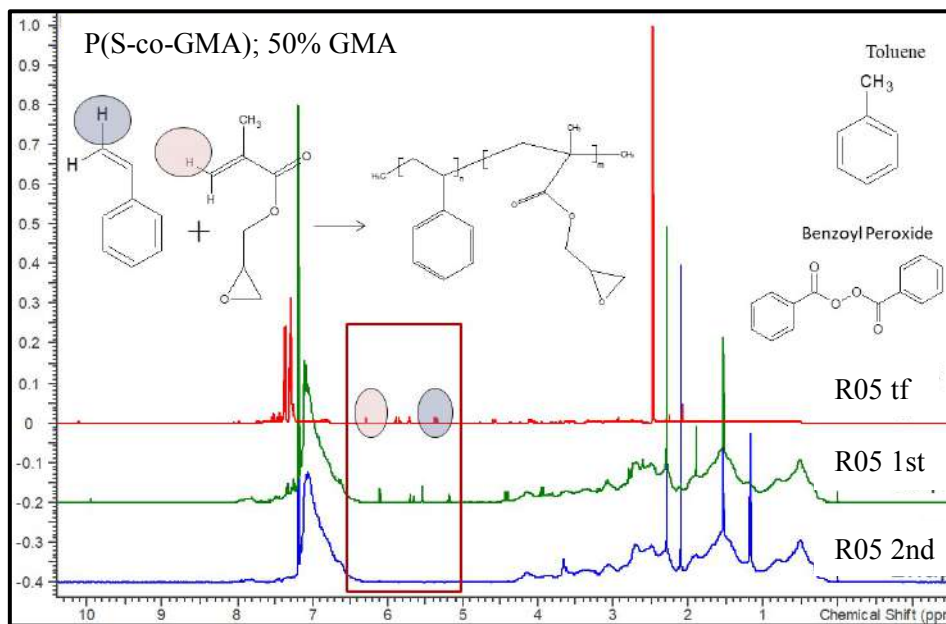
**Figura 67.** Conversão de cada um dos monômeros (Reação 17; 50% GMA) obtida a partir da análise: **(A)** GC; **(B)** RMN.

Apenas para ilustrar a maneira empregada para calcular a conversão de cada comonômero com base nos espectros de RMN, é mostrada a Figura 68. É possível observar que os picos relativos às duplas ligações dos compostos monoméricos diminuem com o decorrer da reação de polimerização. A partir da queda da intensidade da dupla ligação relativa a cada um dos monômeros, foi possível calcular a conversão de cada um em cada uma das reações.



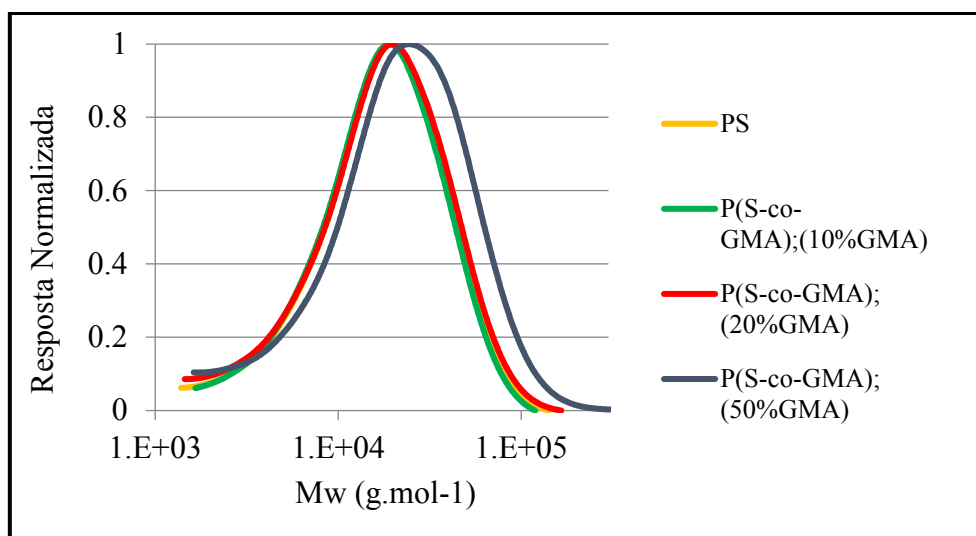
**Figura 68.** Espectros de RMN obtidos para a Reação 05 (P(S-co-GMA), 50%GMA): t0 (espectro obtido no início da reação) e tf (espectro encontrado ao final da reação de polimerização).

Com o objetivo de evidenciar a eficiência do processo de purificação dos materiais poliméricos, é mostrada a Figura 69. É possível notar nos materiais submetidos a duas etapas de purificação a ausência dos picos relativos às duplas ligações características das ligações vinílicas (presentes nos comonômeros), comprovando a ausência de monômeros residuais nos polímeros finais.



**Figura 69.** Espectros de RMN obtidos para os materiais poliméricos de (P(S-co-GMA), 50%GMA): R05tf (solução polimérica obtida ao final da reação de polimerização); R05 1st (material polimérico produzido após a primeira etapa de purificação); R05 2nd (material polimérico final, produzido ao final da segunda etapa de purificação).

Em seguida, os materiais produzidos foram avaliados quanto às distribuições das massas molares das cadeias poliméricas, como mostrado na Figura 70. É possível observar que o aumento da concentração de GMA no meio reacional provoca um leve deslocamento das curvas de distribuição de massas molares para maiores valores. O mesmo efeito é observado ao analisar os valores numéricos médios das massas molares ( $M_n$ ), como mostrado na Tabela 25. A maior concentração de monômeros de glicidila no meio aumenta a interação entre grupamentos epóxidos de cadeias distintas, havendo um aumento da massa molar dos materiais poliméricos produzidos.



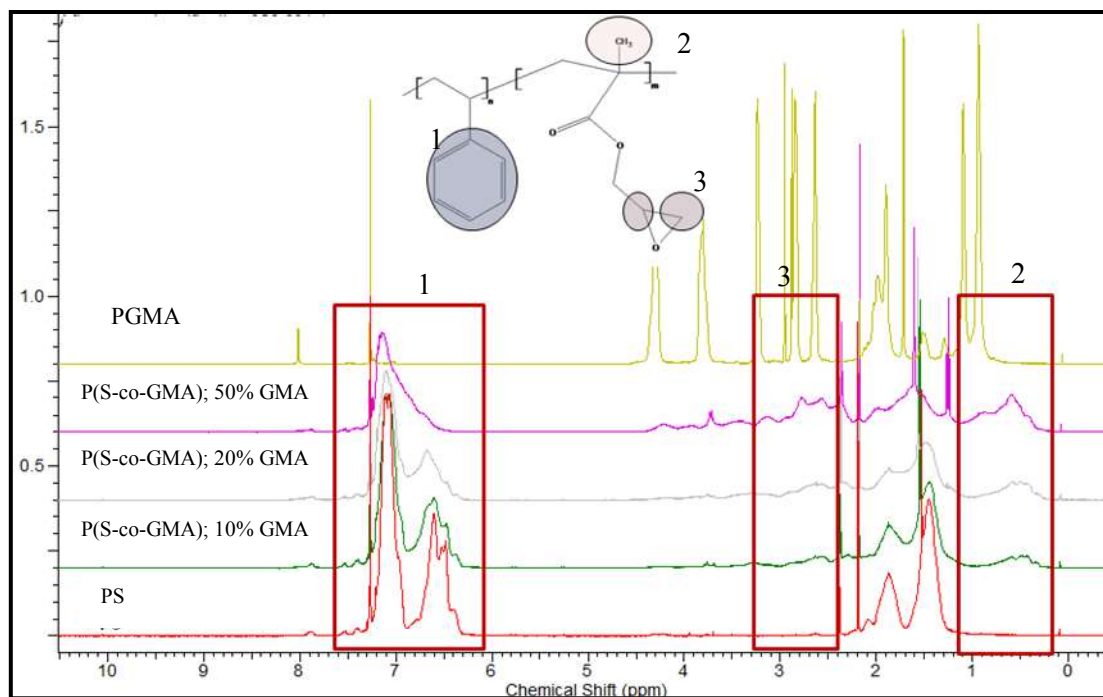
**Figura 70.** Distribuição das massas molares das cadeias poliméricas dos diferentes polímeros produzidos.

**Tabela 25.** Massa molar numérica média ( $M_n$ ) de cada um dos polímeros produzidos no primeiro bloco de reações.

Reação	Legenda	$M_{n,SEC}$ (g.mol <sup>-1</sup> )	PDi	Polímero
R06	PS	10,900	1.96	S <sub>63</sub>
R07	P(S-co-GMA); (10%GMA)	11,000	1.87	S <sub>58-r</sub> -GMA <sub>6</sub>
R08	P(S-co-GMA); (20%GMA)	10,800	2.01	S <sub>52-r</sub> -GMA <sub>12</sub>
R05	P(S-co-GMA); (50%GMA)	12,700	2.18	S <sub>37-r</sub> -GMA <sub>26</sub>
R15	PGMA	17,000 <sup>1</sup>	2.79 <sup>1</sup>	GMA

<sup>1</sup>Valor encontrado empregando-se DMF como solvente.

Na Figura 71 são mostrados os espectros de todos os materiais poliméricos produzidos no primeiro bloco de reações. Primeiramente, percebe-se que não há monômero residual em nenhuma resina final, evidenciando a eficiência do processo de purificação, uma vez que há ausência dos picos relativos às duplas ligações em todos os materiais. Ademais, a incorporação do GMA às cadeias de poliestireno também é mostrada com clareza, uma vez que há o aparecimento dos picos relativos a este material (GMA) nos copolímeros produzidos, como identificado na figura. Nota-se também, como esperado, a diminuição dos picos correspondentes ao anel aromático do comonômero estireno com o aumento do teor de GMA no meio reacional.



**Figura 71.** Espectros de RMN obtidos para cada um dos polímeros produzidos e purificados.

Percebe-se, portanto, que diferentes materiais poliméricos foram produzidos e podem ser empregados na etapa seguinte de funcionalização das cadeias polimérica.

#### 4.2.2.2. Incorporação do PFS às Cadeias Poliméricas

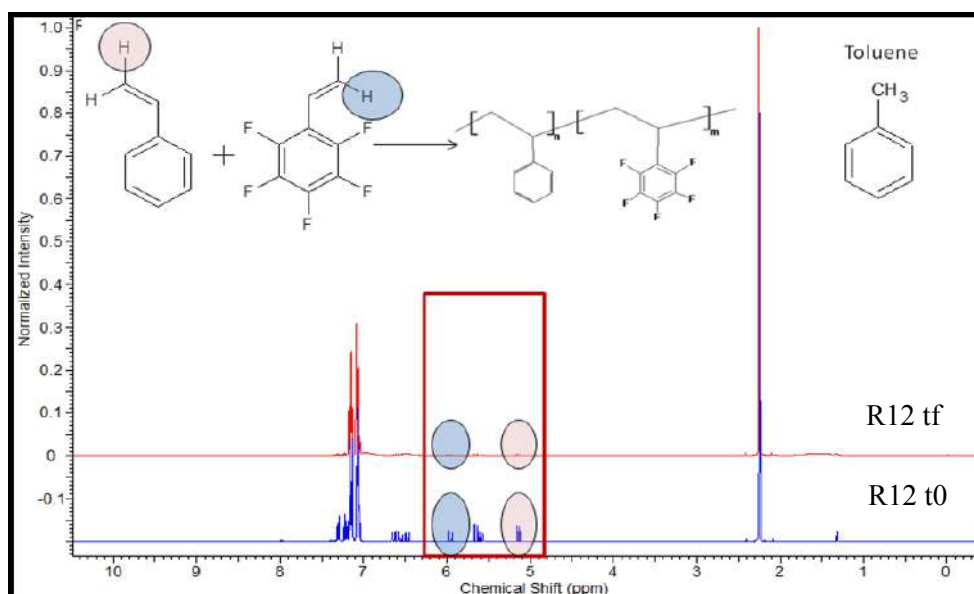
Em um segundo bloco de reações, foi estudada a incorporação do comonômero pentafluoroestireno (PFS) às cadeias de poliestireno (PS). Foram empregadas as mesmas concentrações que as usadas no primeiro bloco de reações (0; 10%; 20%; 50% m/m em relação à massa monomérica total). A conversão de cada comonômero nas reações deste segundo bloco de reações é apresentada na Tabela 26. Pode-se observar que a conversão do PFS é superior à conversão do S, indicando a maior reatividade deste comonômero. Nota-se também que os valores de conversão obtidos a partir de ambas as técnicas de caracterização (GC e RMN) foram novamente semelhantes. Além disso, os resultados encontrados para as duplicatas realizadas (Reações 12 e 18) são similares, confirmando que os resultados encontrados até o momento são confiáveis.



**Tabela 26.** Conversão de cada um dos monômeros em cada uma das reações do segundo bloco de experimentos.

	Legenda	Conversão GC (%)		Conversão RMN (%)		Conversão Total GC (%)	Conversão Total RMN (%)
		S	PFS	S	PFS		
Reação 10	PS	75	-	74	-	74.9	73.7
Reação 11	P(S-co-PFS) (10%PFS)	77	94	75	91	79.3	76.8
Reação 13	P(S-co-PFS) (20%PFS)	79	94	78	93	83.0	81.9
Reação 12	P(S-co-PFS) (50%PFS)	92	89	91	88	90.1	89.2
Reação 18	P(S-co-PFS) (50%PFS)	92	88	90	86	89.4	87.9

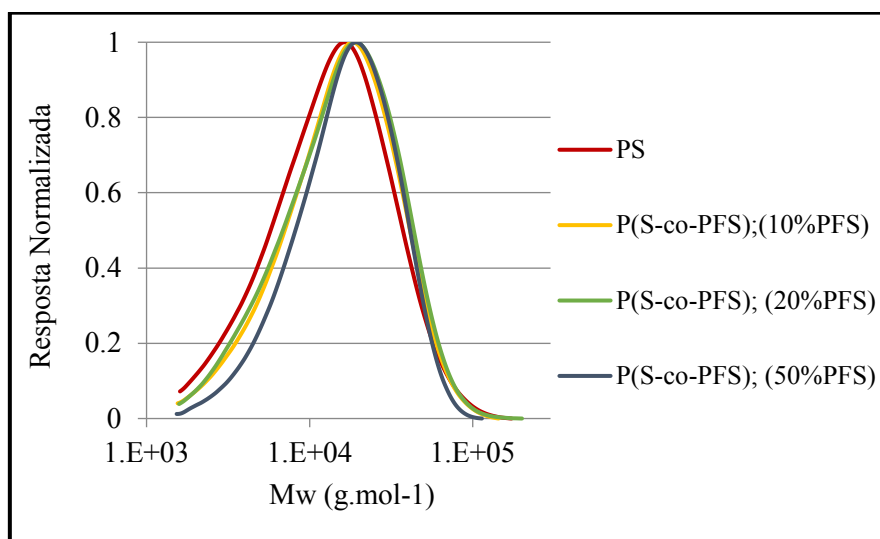
Novamente, apenas para efeito ilustrativo, são mostrados os picos relacionados às duplas ligações dos compostos monoméricos na Figura 72. A partir da queda da intensidade da dupla ligação correspondente a cada composto, foi possível calcular a conversão de cada monômero em cada uma das reações.



**Figura 72.** Espectros de RMN das soluções poliméricas produzidas (P(S-co-PFS); 50%PFS): t0 (início da reação) e tf (solução polimérica obtida ao final da reação).

Na Figura 73 são apresentadas as distribuições das massas molares das cadeias poliméricas dos polímeros produzidos. Nota-se que os resultados encontrados para este bloco de reações foram muito semelhantes entre si. Contudo, ao analisar os valores médios ( $M_n$ ), na Tabela 27, nota-se um pequeno aumento nos valores das massas molares

com o aumento da concentração de PFS no meio reacional, em decorrência da massa molar mais elevada do comonômero de flúor.



**Figura 73.** Distribuição das massas molares das cadeias poliméricas dos polímeros produzidos no segundo bloco de experimentos.

**Tabela 27.** Massas molares médias de cada um dos copolímeros produzidos no segundo bloco de experimentos.

Reação	Legenda	$M_{n,SEC}$ (g.mol <sup>-1</sup> )	PDI	Polímero
R10	PS	9,300	1.91	S <sub>84</sub>
R11	P(S-co-PFS); (10%PFS)	10,400	1.92	S <sub>78-r</sub> -PFS <sub>8</sub>
R13	P(S-co-PFS); (20%PFS)	10,300	1.96	S <sub>75-r</sub> -PFS <sub>16</sub>
R18	P(S-co-PFS); (50%PFS)	15,500	1.61	S <sub>54-r</sub> -PFS <sub>32</sub>

A composição de cada um dos polímeros sintetizados no segundo bloco de reações é mostrada na Figura 74. Primeiramente, a ausência de monômeros residuais em cada um dos materiais produzidos é evidenciada, uma vez que não há picos relativos às duplas ligações. Novamente, a incorporação do comonômero PFS é facilmente observada nos espectros de <sup>1</sup>H. Essa incorporação é ainda mais evidente ao analisar os espectros de flúor das diferentes resinas produzidas na Figura 75. É possível notar que o aumento da concentração de PFS no meio reacional é acompanhado pelo aumento e alargamento do

sinal correspondente a cada átomo de flúor nas posições *orto*-, *meta*- e *para*- nos materiais poliméricos produzidos e purificados.

Dessa forma, um segundo conjunto de resinas poliméricas contendo grupamentos flúor foi sintetizado e pode ser empregados na etapa seguinte de funcionalização.

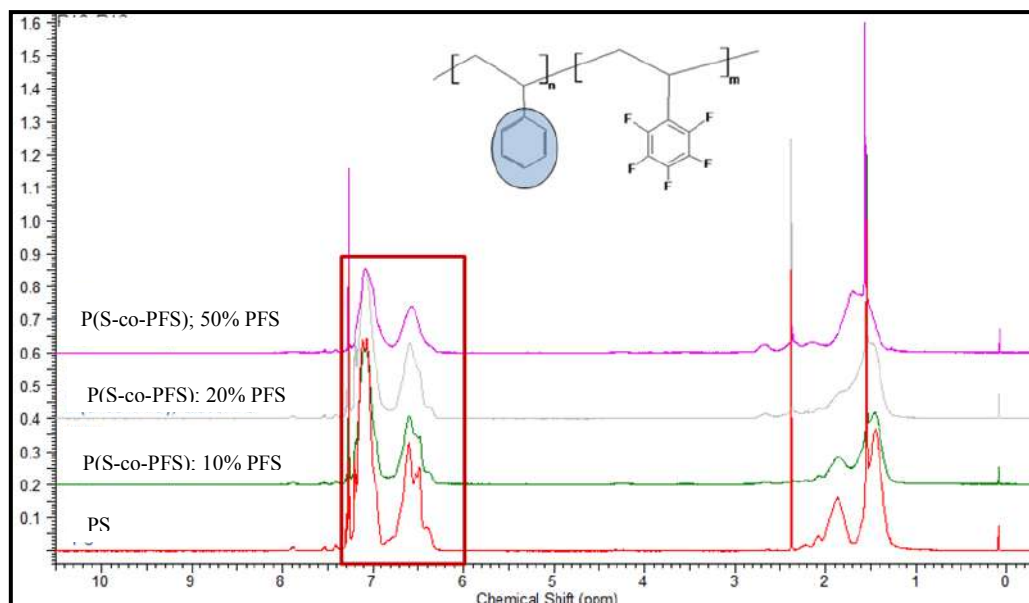


Figura 74. Espectros de RMN dos diferentes polímeros produzidos e purificados,  $^1\text{H}$ .

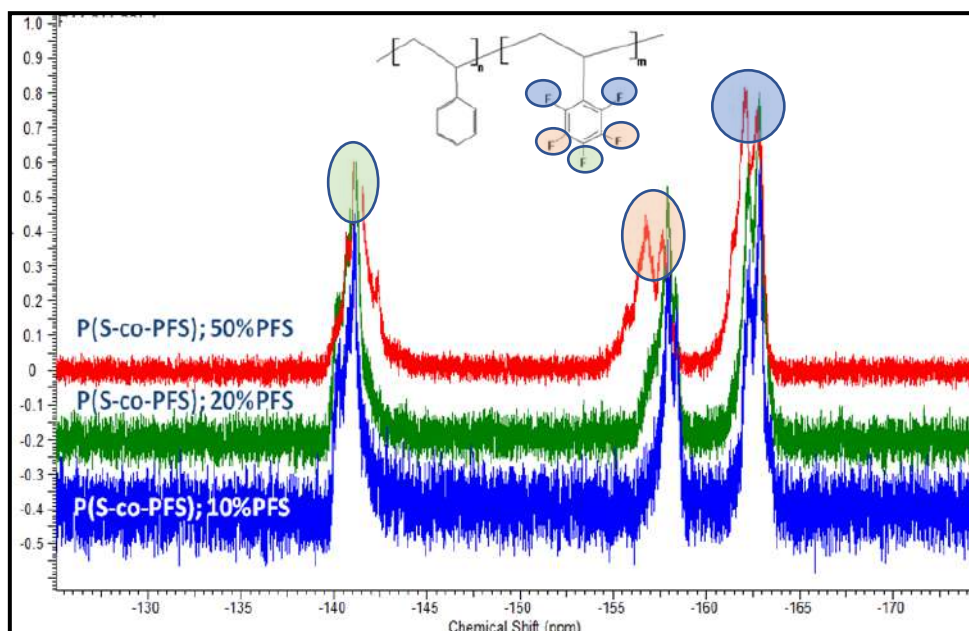
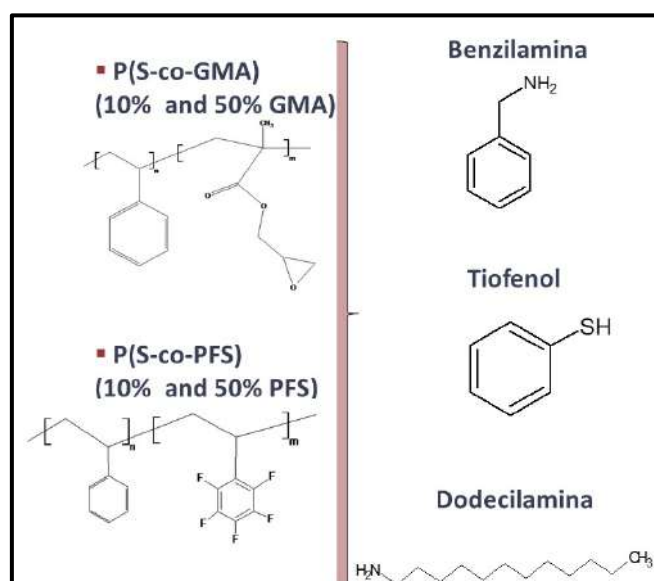


Figura 75. Espectros de RMN dos polímeros produzidos e purificados,  $^{19}\text{F}$ .

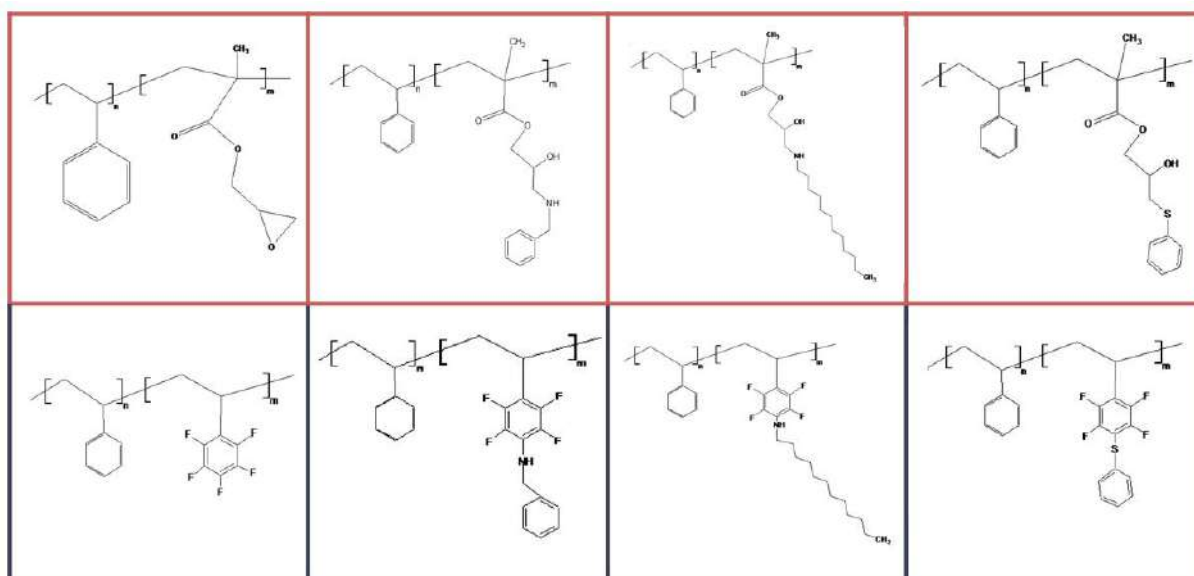
### 4.2.2.3. Funcionalização das Matrizes Poliméricas

Após a síntese dos diferentes materiais poliméricos, contendo diferentes teores de GMA e PFS, uma terceira série de experimentos envolvendo a funcionalização desses materiais foi conduzida. Os materiais poliméricos contendo 10 e 50% de GMA e 10 e 50% de PFS foram selecionados e empregados nas reações de funcionalização. Como mencionado anteriormente, os compostos funcionais utilizados foram benzilamina, dodecilamina e tiofenol. Cada uma das estruturas envolvidas na reação de funcionalização é apresentada na Figura 76.



**Figura 76.** Compostos funcionais empregados nas reações de funcionalização.

Com o objetivo de facilitar a identificação dos grupamentos funcionais que se pretende adicionar às cadeias poliméricas após as reações de funcionalização, é mostrada a Figura 77. Dessa forma, busca-se produzir materiais poliméricos contendo diferentes propriedades de superfície, sendo capazes de interagir de formas diversas com enzimas distintas.



**Figura 77.** Grupos funcionais inseridos às cadeias poliméricas após as reações de funcionalização.

A conversão correspondente a cada composto funcional nas reações de funcionalização é mostrada na Tabela 28. Primeiramente, é possível observar que as reações de funcionalização envolvendo a abertura do anel epóxido (10% e 50% de GMA) ocorreram quando foram empregadas ambas as aminas e o tiofenol. Contudo, as reações em que tiofenol foi utilizado apresentaram conversões de epóxido acima de 100%, indicando que este composto reage com outros componentes presentes no meio reacional (possivelmente com o próprio tiofenol) e não somente com os grupamentos epóxidos inseridos nas cadeias poliméricas.

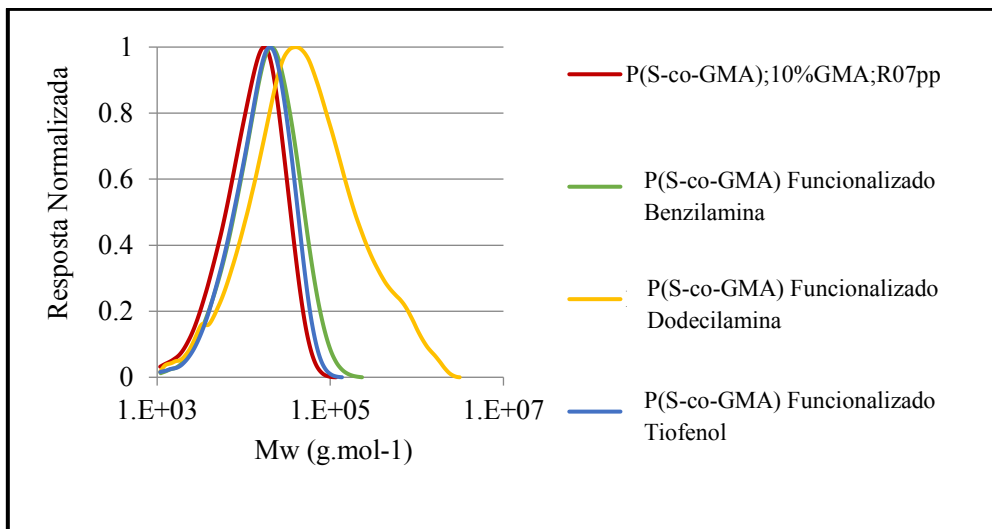
Ao analisar o bloco de materiais contendo PFS, percebe-se que aparentemente só houve reação do tipo *Click* quando o tiofenol foi empregado juntamente com o polímero contendo 50% PFS. Novamente, a conversão de *p*-F observada esteve acima de 100%, indicando que o tiofenol reage com outros componentes da reação e não apenas com os átomos de flúor na posição *para*-. Dessa forma, visando a um aumento na inserção desses grupamentos funcionais nas cadeias poliméricas, novas condições reacionais devem ser investigadas, como aumento da temperatura de reação, por exemplo.

**Tabela 28.** Conversão de cada uma das reações de funcionalização.

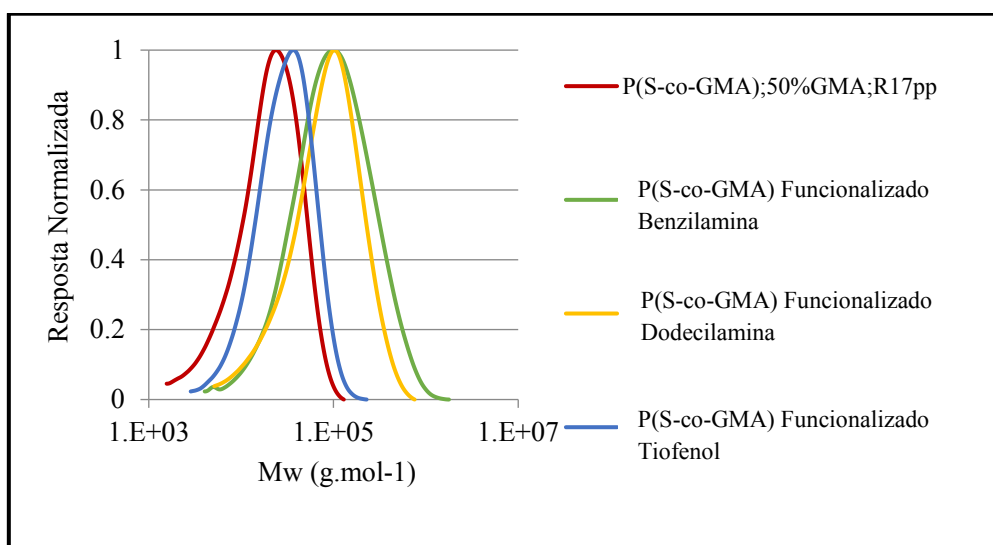
	Legenda	Polímero	Conversão (RMN) (%)
Funcionalização_14	(R07pp; 10%GMA; Benzilamina)	S <sub>58-r</sub> -GMA <sub>6</sub>	1
Funcionalização_15	(R07pp; 10%GMA; Dodecilamina)	S <sub>58-r</sub> -GMA <sub>6</sub>	4
Funcionalização_16	(R07pp; 10%GMA; Tiofenol)	S <sub>58-r</sub> -GMA <sub>6</sub>	231
Funcionalização_17	(R17pp; 50%GMA; Benzilamina)	S <sub>38-r</sub> -GMA <sub>28</sub>	13
Funcionalização_18	(R17pp; 50%GMA; Dodecilamina)	S <sub>38-r</sub> -GMA <sub>28</sub>	18
Funcionalização_19	(R17pp; 50%GMA; Tiofenol)	S <sub>38-r</sub> -GMA <sub>28</sub>	223
Funcionalização_20	(R11pp; 10%PFS; Benzilamina)	S <sub>78-r</sub> -PFS <sub>8</sub>	0
Funcionalização_21	(R11pp; 10%PFS; Dodecilamina)	S <sub>78-r</sub> -PFS <sub>8</sub>	0
Funcionalização_22	(R11pp; 10%PFS; Tiofenol)	S <sub>78-r</sub> -PFS <sub>8</sub>	0
Funcionalização_23	(R18pp; 50%PFS; Benzilamina)	S <sub>54-r</sub> -PFS <sub>32</sub>	0
Funcionalização_24	(R18pp; 50%PFS; Dodecilamina)	S <sub>54-r</sub> -PFS <sub>32</sub>	0
Funcionalização_25	(R18pp; 50%PFS; Tiofenol)	S <sub>54-r</sub> -PFS <sub>32</sub>	340

Na Figura 78 são apresentadas as distribuições de massas molares das cadeias poliméricas dos materiais produzidos, contendo 10% e 50% de GMA. É possível notar que, após as reações de funcionalização com ambas as aminas e com o tiofenol, ocorreu um deslocamento das curvas de distribuição para maiores valores. Esse efeito é ainda mais pronunciado ao observar o grupo de reações em que os polímeros contendo 50% GMA foram empregados. Dessa forma, esses resultados indicam que as reações de *Click Chemistry* de abertura do anel epóxido durante as reações de funcionalização ocorreram nas condições reacionais selecionadas. Contudo, é importante ressaltar que o efeito de aumento de massa molar é mais pronunciado ao empregar as aminas quando comparadas com as distribuições de massas molares das resinas funcionalizadas com tiofenol. Esse comportamento pode ser resultado de dois efeitos: ou a incorporação do tiofenol às cadeias poliméricas ocorre durante a funcionalização, mas a uma conversão mais baixa (ao comparar com as aminas), reagindo preferencialmente com outros componentes do meio reacional (por isso, a conversão final acima de 100%); ou a baixa ocorrência de reações de abertura do anel epóxido com os grupamentos amina favoreceu uma maior interação entre os grupamentos epóxido de cadeias poliméricas distintas, resultando em um aumento da massa molar mesmo a baixas conversões (como observado nos resultados de conversão, apresentados anteriormente)

Efeito semelhante foi observado ao analisar os valores das massas molares médias na Tabela 29. Nota-se o aumento das massas molares numéricas médias após as reações de funcionalização, o que novamente indica a ocorrência das reações de funcionalização.



(A)



(B)

**Figura 78.** Distribuição de massas molares dos polímeros produzidos após as reações de funcionalização: **(A)** (P(S-co-GMA); 10%GMA); **(B)** (P(S-co-GMA); 50%GMA).

**Tabela 29.** Massas molares numéricas médias ( $M_n$ ) dos polímeros produzidos após a funcionalização do grupo epóxido.

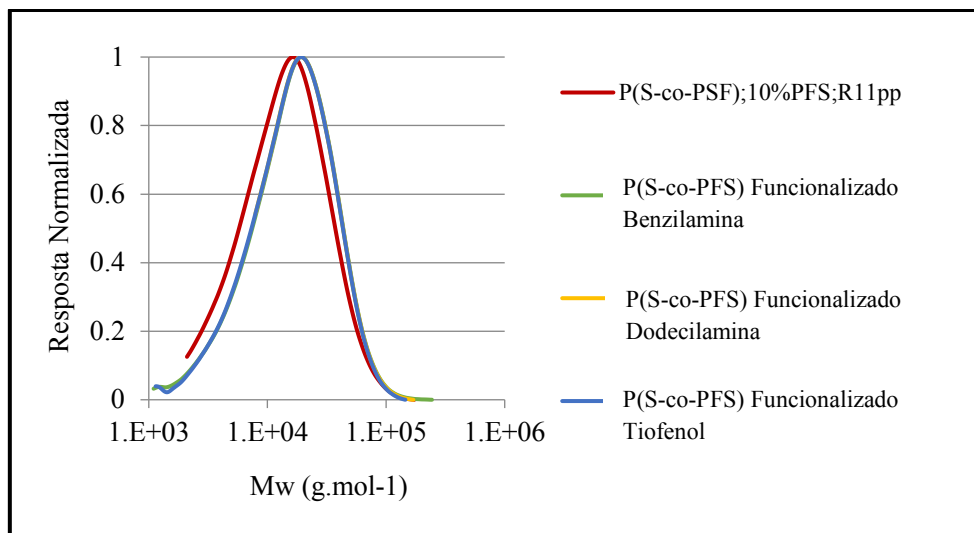
Legenda	$M_{n,SEC}$ (g.mol <sup>-1</sup> )	PDi
P(S-co-GMA) (10%GMA)	8,700	1.87
P(S-co-GMA) (10%GMA); Benzilamina	11,800	2.02
P(S-co-GMA) (10%GMA); Dodecilamina	17,900	7.28
P(S-co-GMA) (10%GMA); Tiofenol	11,100	1.80
P(S-co-GMA) (50%GMA)	13,000	1.90
P(S-co-GMA) (50%GMA); Benzilamina	57,600	2.43
P(S-co-GMA) (50%GMA); Dodecilamina	50,500	2.17
P(S-co-GMA) (50%GMA); Tiofenol	22,900	1.55

Observam-se na Figura 79 as distribuições das massas molares das cadeias poliméricas do bloco de polímeros contendo 10% e 50% de PFS. É possível notar que, mesmo após as reações de funcionalização, não foi observada qualquer alteração ou deslocamento das curvas de distribuição. Ao analisar as massas molares numéricas médias ( $M_n$ ), Tabela 30, percebe-se que resultados semelhantes foram encontrados para os diferentes materiais produzidos. Dessa forma, com base nessas análises, a ocorrência de reações do tipo *Click* entre os átomos de flúor na posição *para*- e os diferentes compostos funcionais não parece ter ocorrido de forma muito expressiva.

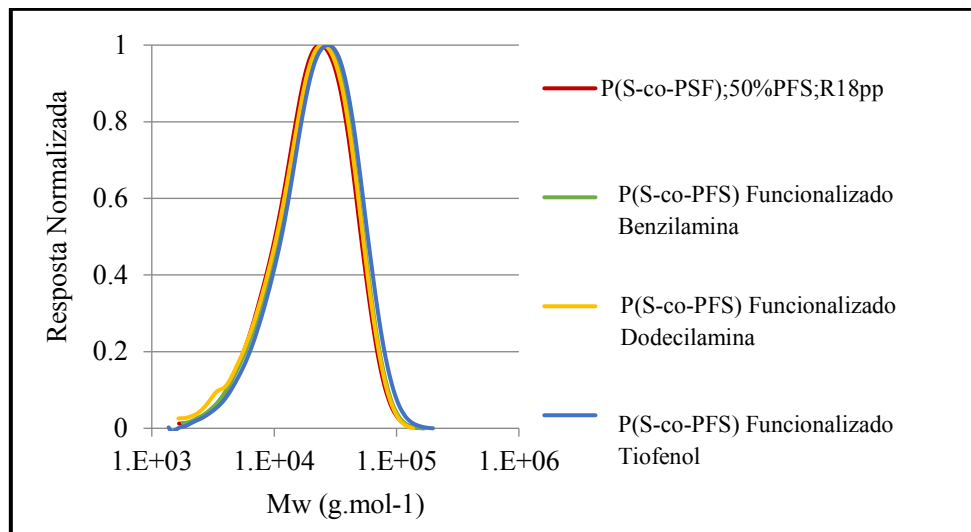
**Tabela 30.** Massas molares médias numéricas ( $M_n$ ) dos polímeros produzidos após a funcionalização do flúor.

Legenda	$M_{n,SEC}$ (g.mol <sup>-1</sup> )	PDi
P(S-co-PFS) (10%PFS)	10,400	1.92
P(S-co-PFS) (10%PFS); Benzilamina	10,200	2.05
P(S-co-PFS) (10%PFS); Dodecilamina	10,500	1.96
P(S-co-PFS) (10%PFS); Tiofenol	10,600	1.92
P(S-co-PFS) (50%PFS)	15,500	1.61
P(S-co-PFS) (50%PFS); Benzilamina	15,900	1.65
P(S-co-PFS) (50%PFS); Dodecilamina	14,300	1.77
P(S-co-PFS) (50%PFS); Tiofenol	16,400	1.76





(A)



(B)

**Figura 79.** Distribuição das massas molares dos polímeros produzidos após as reações de funcionalização: **(A)** (P(S-co-PFS); 10%PFS); **(B)** (P(S-co-PFS); 50%PFS).

Na busca por novas técnicas que indicassem a incorporação dos compostos funcionais às cadeias poliméricas, foram realizadas análises para determinar o grau de hidrofobicidade das resinas produzidas. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 31. Nota-se que para esta análise foram selecionados apenas os materiais contendo 50% de GMA e 50% de PFS. Inicialmente percebe-se que a adição de GMA e PFS às cadeias poliméricas de poliestireno afetam as propriedades de superfície, uma vez que resinas poliméricas mais hidrofílicas e mais hidrofóbicas respectivamente foram obtidas após a inserção desses comonômeros. Contudo, ao analisar os resultados encontrados para os

materiais à base de GMA e à base de PFS, não se percebe nenhuma diferença significativa no grau de hidrofobicidade dos polímeros não-funcionalizados e dos materiais que conteriam os compostos funcionais, uma vez que ângulos de contato similares foram obtidos. Dessa forma, não é possível confirmar por essas análises se tais compostos provocaram modificações significativas nas propriedades de superfície dos suportes poliméricos. Vale destacar que para as duplicatas realizadas (Reações 06pp e Reação 10pp; Reação 12pp e Reação 18pp) valores similares foram obtidos, reforçando a confiabilidade dos dados encontrados.

**Tabela 31.** Ângulo de contato encontrado para os diferentes materiais produzidos.

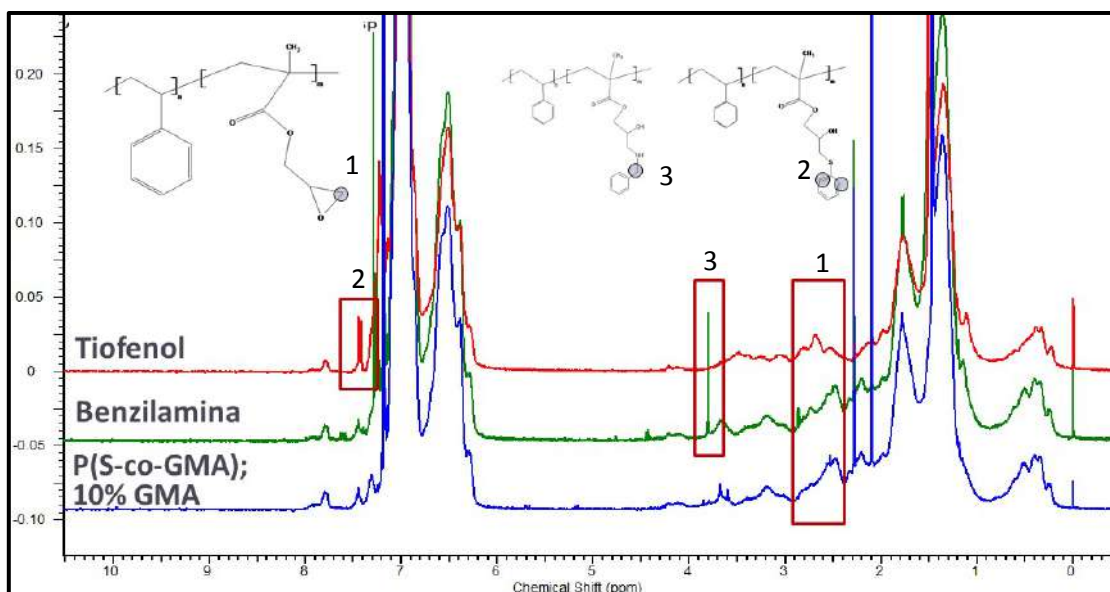
Reações	Legenda	Ângulo de Contato (°)
R06pp	PS	88,1 ± 0,3
R10pp	PS	89,2 ± 0,8
R05pp	P(S-co-GMA); (50%GMA)	74,6 <sup>1</sup>
R15pp	PGMA	62,4 ± 0,7
F17p	P(S-co-GMA) (50%GMA);50%GMA; Benzilamina	75,5 <sup>1</sup>
F18p	P(S-co-GMA) (50%GMA);50%GMA; Dodecilamina	71,2 <sup>1</sup>
F19p	P(S-co-GMA) (50%GMA);50%GMA; Tiofenol	- <sup>2</sup>
R12pp	P(S-co-PFS) (50%PFS)	99,8 <sup>1</sup>
R18pp	P(S-co-PFS); (50%PFS)	97,4 ± 3,9
F23p	P(S-co-PFS); (50%PFS); Benzilamina	94,7 <sup>1</sup>
F24p	P(S-co-PFS); (50%PFS); Dodecilamina	91,3 <sup>1</sup>
F25p	P(S-co-PFS); (50%PFS); Tiofenol	93,7 ± 0,6

<sup>1</sup> Não foi possível realizar duplicatas dessas análises; <sup>2</sup> Não foi possível determinar o ângulo de contato de tal amostra.

Os polímeros foram caracterizados, por fim, por análises de RMN. Na Figura 80 são apresentadas as composições dos materiais funcionalizados e purificados, empregando o polímero (P(S-co-GMA); 10% GMA). Nota-se que os picos característicos dos compostos funcionais (benzilamina e tiofenol) apareceram no material final purificado, indicando a inserção desses componentes às cadeias poliméricas.

A partir da diminuição relativa da intensidade do grupamento epóxido (2 - 3 ppm) (empregando o pico <sup>1</sup>H do CH<sub>3</sub> das moléculas de GMA, como referência) foi possível calcular o grau de abertura do anel, obtendo-se: 5%, quando a benzilamina foi empregada,

e 35%, quando o tiofenol foi usado. Esse resultado corrobora a análise de que o tiofenol reage com outros componentes do meio reacional e não apenas com o grupamento epóxido. É importante mencionar que os polímeros contendo 10% de GMA funcionalizados com dodecilamina e todos os polímeros funcionalizados à base de 50% de GMA não solubilizaram em clorofórmio, solvente utilizado nas análises de RMN. Dessa forma, a não solubilização desses materiais após a etapa de funcionalização é mais um indício da ocorrência de reações do tipo *Click Chemistry* nas condições operacionais empregadas.

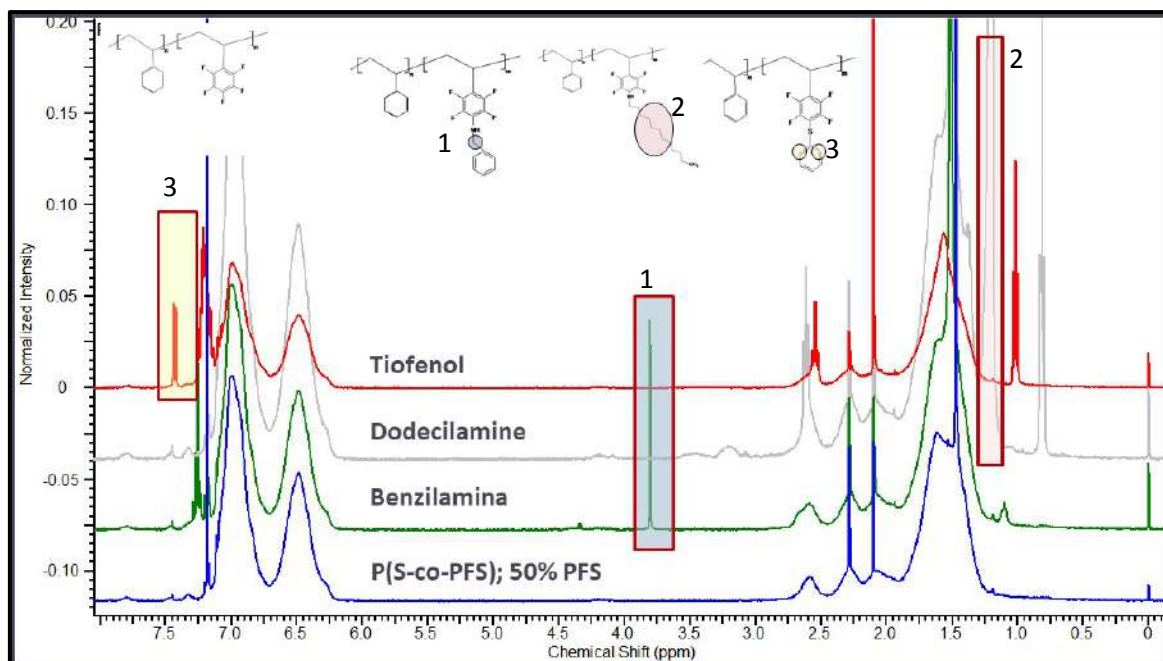


**Figura 80.** Espectros de RMN dos polímeros produzidos e purificados após as reações de funcionalização (P(S-co-GMA); 10%GMA).

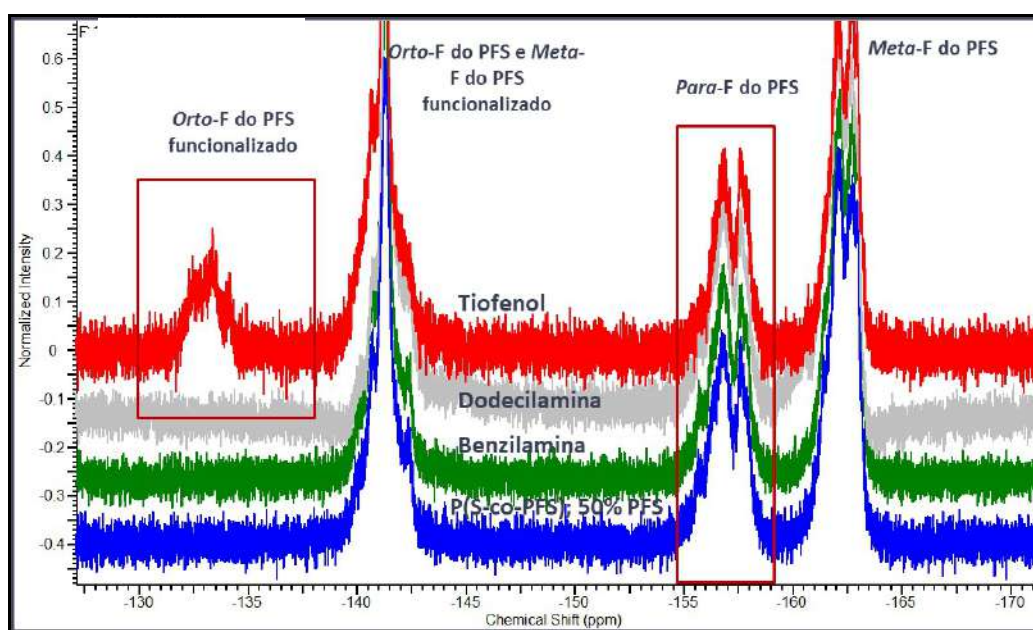
Os resultados obtidos para os materiais à base de PFS são mostrados na Figura 81 (para simplificar, são apresentados apenas os resultados das resinas à base de 50% de PFS). É possível observar que os picos relativos a cada um dos grupamentos funcionais surgem no material final purificado, indicando a inserção desses compostos funcionais nas cadeias dos copolímeros.

Contudo, ao analisar a Figura 82, percebe-se que os espectros de  $^{19}\text{F}$  são semelhantes para os diferentes materiais analisados. Após reações do tipo *Click* com compostos à base de pentafluoroestireno, espera-se que haja uma diminuição do pico relativo ao *p*-F (única posição que reage com o grupamento tiol) e o aparecimento de um novo pico *orto*-F (que surge após a reação de funcionalização). No entanto, apenas

quando o tiofenol foi empregado notou-se a clara ocorrência da reação de funcionalização, apresentando uma conversão de 18%. Dessa forma, a ocorrência das demais reações do tipo *Click*, com os demais compostos funcionais (benzilamina e dodecilamina), ainda não é conclusiva.



**Figura 81.** Espectros de  $^1\text{H}$  RMN dos polímeros produzidos e purificados após as reações de funcionalização, (P(S-co-PFS); 50%PFS).



**Figura 82.** Espectros de  $^{19}\text{F}$  RMN dos polímeros produzidos e purificados após as reações de funcionalização, (P(S-co-PFS); 50%PFS).



### 4.3.1. *Materiais e Metodologias*

As nanopartículas poliméricas foram sintetizadas por meio da técnica de polimerização em emulsão, empregando uma mistura monomérica constituída por estireno (S) e divinilbenzeno (DVB) e variando as concentrações dos comonômeros metacrilato de glicidila (GMA) ou pentafluoroestireno (PFS). Todos os monômeros apresentaram pureza mínima de 99% e foram fornecidos pela Sigma-Aldrich (UK). É importante destacar que cada reagente foi empregado como obtido, sem haver qualquer etapa intermediária de purificação.

O iniciador utilizado foi persulfato de potássio P.A. ( $K_2S_2O_8$ ) com pureza mínima de 99%. O emulsificante empregado foi lauril sulfato de sódio (SLS) com pureza mínima de 99%. O sal utilizado na síntese da solução tampão foi o bicarbonato de sódio com pureza mínima de 99% ( $NaHCO_3$ ). Novamente, foi empregada a trietilamina (TEA) como catalisador, apresentando pureza mínima de 99%. Os reagentes foram também fornecidos pela Sigma-Aldrich (UK). Água destilada foi utilizada para preparar as soluções aquosas de PVA,  $K_2S_2O_8$ , SLS e  $NaHCO_3$ .

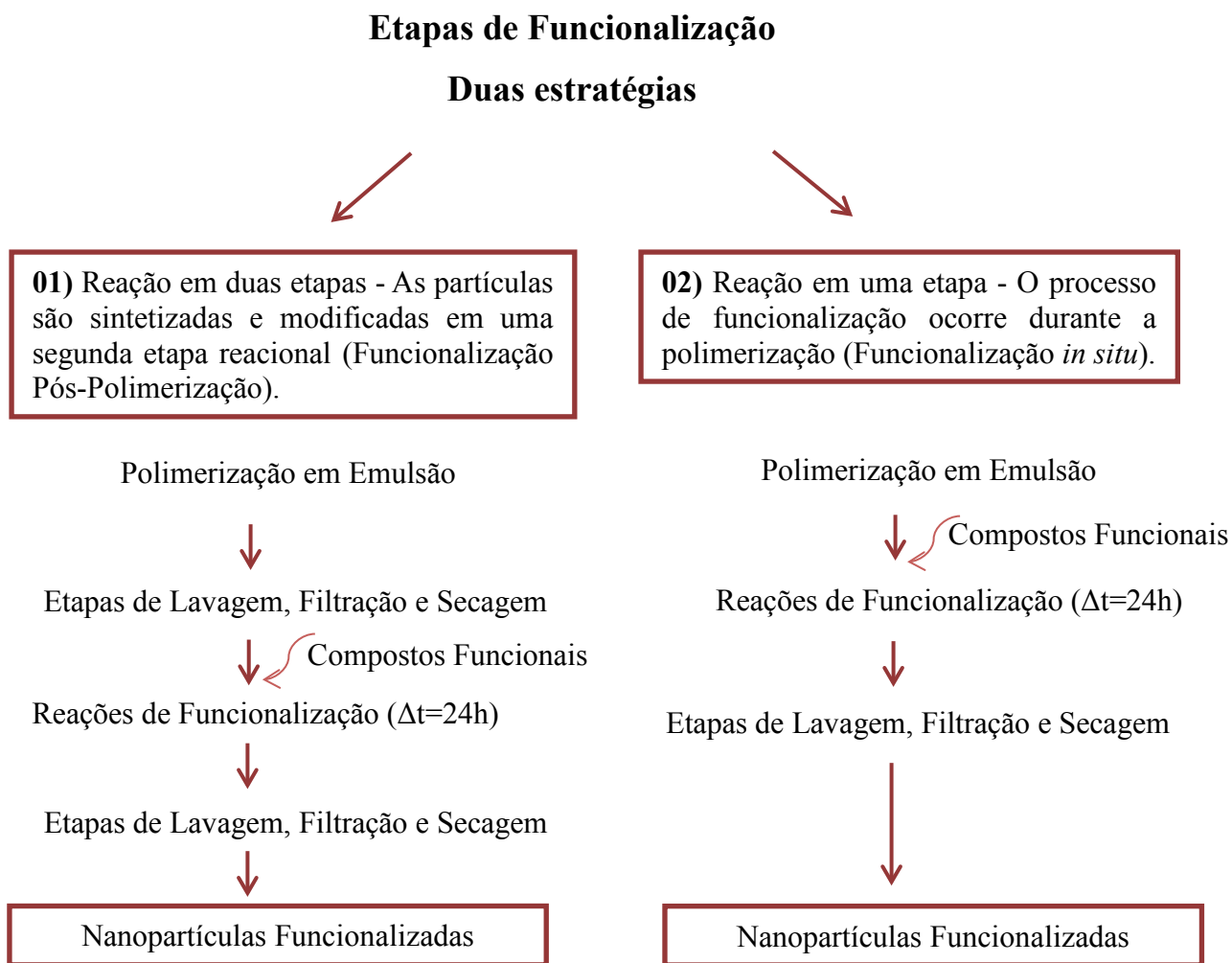
As reações de polimerização foram conduzidas em balões volumétricos a 85 °C sob agitação magnética em um regime de semi-batelada, de forma a evitar o descontrole térmico da reação (empregando procedimento semelhante ao descrito no *Capítulo II*). Assim, eram adicionados ao balão volumétrico uma solução aquosa de lauril sulfato de sódio (SLS, 1 % m/m), uma solução aquosa de bicarbonato de sódio ( $NaHCO_3$ , 0,1 % m/m), água destilada (70% m/m), uma carga inicial de comonômeros (1,5 g) e, em seguida, a solução aquosa do iniciador persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ , 0,1 % m/m). Todas as percentagens apresentadas correspondem ao teor mássico total. A alimentação da mistura monomérica (3,5 g) era subdividida em 6 cargas adicionadas a cada 10 minutos. Após o término da alimentação, prosseguia-se com mais 2 h de reação em emulsão. A mistura monomérica foi constituída por estireno (S) e divinilbenzeno (DVB, fixado em 25% m/m em relação à massa monomérica total), variando as concentrações dos comonômeros reativos, metacrilato de glicidila (GMA) ou pentafluoroestireno (PFS) (0%; 10%; e 50% m/m em relação à massa monomérica total). Em todas as reações a massa final foi de 15 g.

Foram propostas duas estratégias de reação, de forma a avaliar e determinar a maneira mais eficaz para a funcionalização das nanopartículas poliméricas: a funcionalização pós-polimerização e a funcionalização *in situ*.

Nas reações de funcionalização *in situ*, inicialmente era conduzida apenas a reação de polimerização em emulsão alimentada, seguindo-se com mais 2 horas de reação para formação das partículas. Após esse período, eram adicionados os compostos funcionais (tiofenol e benzilamina), em excesso, e o catalisador (triethylamina, TEA), também em excesso. Empregou-se a mesma proporção molar descrita anteriormente, baseando-se na conversão calculada para os comonômeros GMA e PFS (1 mol comonômero reativo : 5 mol de composto funcional : 3 mols de TEA). As reações foram conduzidas por 24h.

Nas reações de funcionalização pós-polimerização, as partículas eram sintetizadas, como descrito anteriormente, lavadas com etanol e secas. Após a secagem, os componentes funcionais em excesso (tiofenol e benzilamina) eram adicionados a 1 g de cada material polimérico previamente dispersos em tolueno (5 mL). Vale destacar que triethylamina (novamente empregada em excesso) foi empregada como catalisador das reações de funcionalização. Foi usada a mesma proporção molar já descrita (1mol comonômero reativo: 5 mols de composto funcional : 3 mols de TEA). As reações foram conduzidas por 24 h. Na Figura 84 é apresentado um esquema das duas estratégias adotadas.

As reações de síntese das nanopartículas a partir da funcionalização pós-polimerização são mostradas nas Tabelas 32 (primeira etapa da reação) e 33 (reação de funcionalização propriamente dita). Na Tabela 34 são apresentadas as reações de produção das nanopartículas via funcionalização *in situ*. Todas as percentagens apresentadas correspondem ao teor mássico de cada monômero em relação à carga monomérica total.



**Figura 84.** Esquema das estratégias de funcionalização das nanopartículas poliméricas.

**Tabela 32.** Primeira etapa da reação de polimerização pós-polimerização.

Reações	Legenda
Referência	Benchmark - Nanopartículas – Reator de 1L (Reação: 14)
EP02	P(S-co-DVB)
EP08	P(S-co-DVB-co-GMA); 10%GMA
EP10	P(S-co-DVB-co-GMA); 50%GMA
EP14	P(S-co-DVB-co-PFS); 10%PFS
EP16	P(S-co-DVB-co-PFS); 50%PFS



**Tabela 33.** Etapa de funcionalização das nanopartículas pós-polimerização (PP).

Reação	Legenda
F26	PP (EP02_0%; Benzilamina)
F27	PP (EP02_0%; Tiofenol)
F28	PP (EP08_10%GMA; Benzilamina )
F29	PP (EP08_10%GMA; Tiofenol)
F30	PP (EP10_50%GMA; Benzilamina)
F31	PP (EP10_50%GMA; Tiofenol)
F32	PP (EP14_10%PFS; Benzilamina)
F33	PP (EP14_10%PFS; Tiofenol)
F34	PP (EP16_50%PFS; Benzilamina)
F35	PP (EP16_50%PFS; Tiofenol)

**Tabela 34.** Reações de polimerização e funcionalização *in situ* (IS).

Reação	Legenda
EP05	IS (0%GMA; Benzilamina)
EP18	IS (10%GMA; Benzilamina)
EP19	IS (50%GMA; Benzilamina)
EP20	IS (10%GMA; Tiofenol)
EP21	IS (50%GMA; Tiofenol)
EP22	IS (10%PFS; Benzilamina)
EP23	IS (50%PFS; Benzilamina)
EP24	IS (10%PFS; Tiofenol)
EP25	IS (50%PFS; Tiofenol)

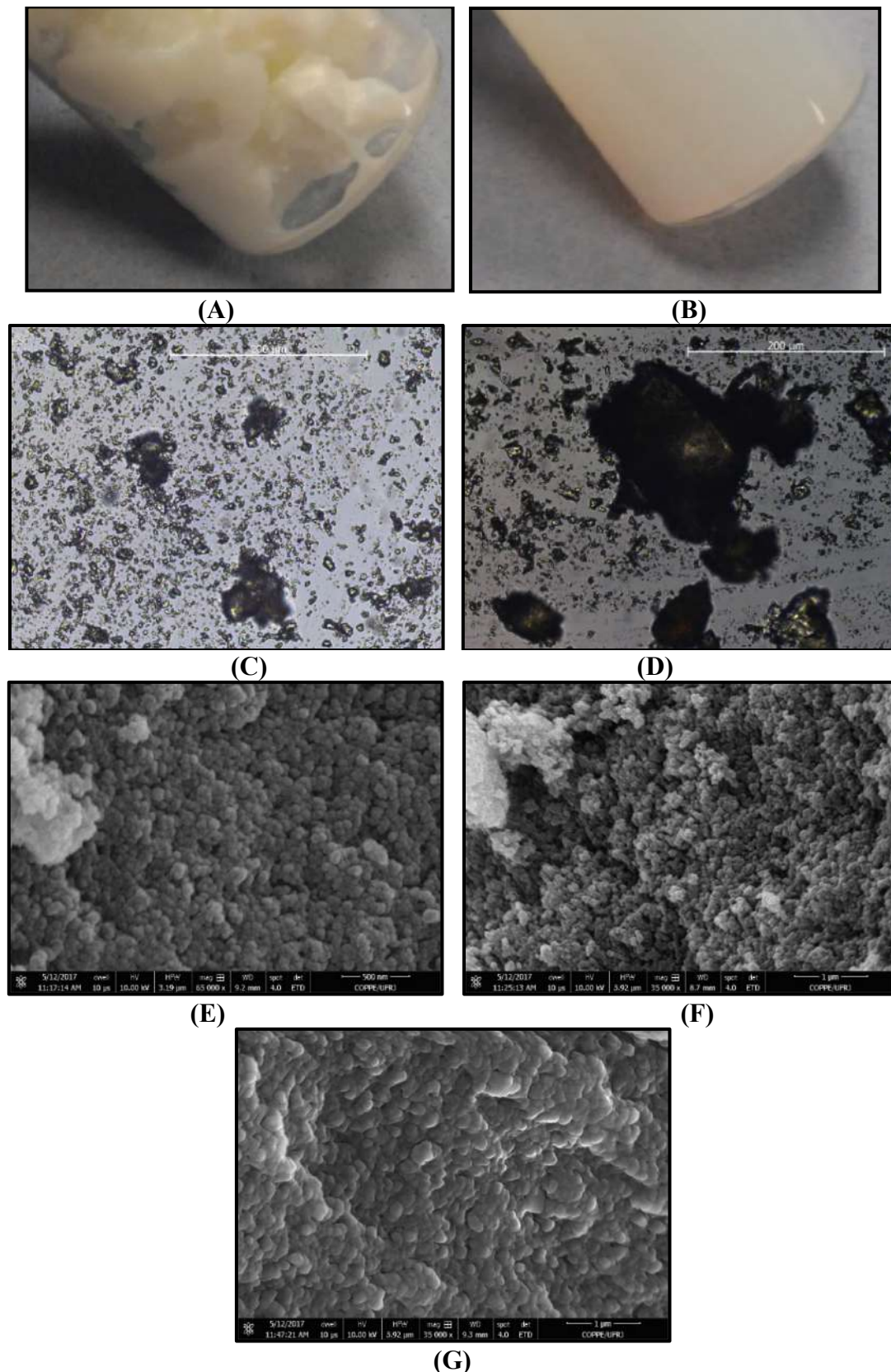
Inúmeras análises foram realizadas com o objetivo de caracterizar as nanopartículas produzidas: microscopia óptica (MO), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise de distribuição de tamanhos de partícula por espalhamento de luz, análise de área específica por fisissorção de nitrogênio e análises para determinar o grau de hidrofobicidade dos materiais produzidos. A seguir será descrita a única técnica que ainda não foi detalhada: Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). Análises de conversão e de rendimento também foram conduzidas por gravimetria. Vale pontuar que para o cálculo do rendimento foi considerado o material final obtido (após as etapas de lavagem e secagem das partículas) e a carga monomérica adicionada durante a reação de polimerização.

#### ***4.2.1.1. Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)***

Foram realizadas análises de FTIR com o objetivo de determinar a composição das partículas poliméricas. As análises de FTIR foram realizadas em um espectrômetro da fabricante Thermo Scientific, modelo Nicolet 6700, utilizando-se uma sonda de ATR durante as análises. As amostras foram avaliadas na condição ambiente, realizando 128 varreduras com resolução de 4 nm em modo de transmitância. A faixa de números de onda aplicados foi de 500 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### ***4.3.2. Resultados***

As morfologias das partículas produzidas são mostradas na Figura 84. É possível notar que muitas partículas de diâmetro pequeno foram produzidas. No entanto, observa-se que muitos aglomerados também foram formados ao longo das reações, principalmente nas reações em que GMA foi adicionado como comonômero, como mostrado na Figura 85 A e Figura 85 D. Partículas menores e mais dispersas foram produzidas nas reações em que PFS foi empregado como comonômero, como pode ser observado ao comparar as Figuras 85 A e 85 B. Ao analisar as micrografias eletrônicas, Figuras 85 E, 85 F e 85 G, fica evidente que partículas em escala nanométrica foram formadas nas reações à base de GMA e de PFS. No entanto, aglomerados também foram formados, em decorrência da instabilidade de algumas emulsões ou dos processos de lavagem e secagem. Não é possível determinar com base apenas nas micrografias se alguma estratégia de funcionalização resultou em maior ou menor grau de aglomeração de partículas.



**Figura 85.** Morfologia das partículas produzidas: **(A)** EP 10 (P(S-co-DVB-co-GMA); 50%GMA); **(B)** EP 16 (P(S-co-DVB-co-PFS); 50%PFS); **(C)** MO: EP 02 (P(S-co-DVB)); **(D)** MO: EP10 (P(S-co-DVB-co-GMA); 50%GMA); **(E)** MEV: EP 19 (IS (50%GMA; Benzilamina)); **(F)** MEV: EP 21 (IS (50%GMA; Tiofenol)); **(G)** MEV: EP 25 (IS (50%PFS; Tiofenol)).

Nas Tabelas 35 e 36 são mostrados os resultados de conversão e de rendimento de cada uma das reações realizadas nas etapas de síntese e de funcionalização. Inicialmente, ao observar a Tabela 35, pode-se perceber que a presença de GMA no meio provocou uma leve queda na conversão monomérica total; enquanto a adição de PFS parece não afetar a conversão. Nota-se também que a adição de PFS provocou uma queda no rendimento das reações. É possível que o aumento na geração de partículas pequenas provoque maior perda de material polimérico durante as etapas de filtração e secagem.

Ao analisar a Tabela 36, observa-se que as conversões das reações de funcionalização pós-polimerização não foram calculadas, pois para condução desta etapa de funcionalização partiu-se das partículas previamente produzidas. Para calcular o rendimento de cada reação, desconsiderou-se a massa adicionada dos compostos funcionais. Dessa forma, rendimentos acima dos obtidos na primeira etapa da reação, mostrados na Tabela 35, indicariam a incorporação de tais componentes. Assim, pode-se notar na maior parte das reações que a adição da benzilamina e do tiofenol provocaram aumento no rendimento final, indicando que ou tais compostos não estão sendo removidos durante o processo de lavagem e secagem ou estão sendo realmente incorporados às cadeias poliméricas.

**Tabela 35.** Conversão e rendimento das reações correspondentes à primeira etapa da funcionalização pós-polimerização.

Reações	Legenda	Conversão	Rendimento (%)
Referência	Benchmark - Nanopartículas - 1L Reator (Reação 14)	0.82	74.2
EP02	P(S-co-DVB)	0.90	69.3
EP08	P(S-co-DVB-co-GMA); 10%GMA	0.89	69.6
EP10	P(S-co-DVB-co-GMA); 50%GMA	0.67	74.9
EP14	P(S-co-DVB-co-PFS); 10%PFS	0.91	34.5
EP16	P(S-co-DVB-co-PFS); 50%PFS	0.82	48.2

**Tabela 36.** Rendimento das reações de funcionalização pós-polimerização.

Reações	Legenda	Rendimento (%)
F26	PP (EP02_0%; Benzilamina)	73.1
F27	PP (EP02_0%; Tiofenol)	61.1
F28	PP (EP08_10%GMA; Benzilamina )	88.0
F29	PP (EP08_10%GMA; Tiofenol)	64.4
F30	PP (EP10_50%GMA; Benzilamina)	117.6
F31	PP (EP10_50%GMA; Tiofenol)	121.9
F32	PP (EP14_10%PFS; Benzilamina)	70.9
F33	PP (EP14_10%PFS; Tiofenol)	76.9
F34	PP (EP16_50%PFS; Benzilamina)	62.3
F35	PP (EP16_50%PFS; Tiofenol)	73.1

Na Tabela 37 são apresentados os rendimentos e as conversões das reações de funcionalização *in situ*. Novamente, para o cálculo da conversão e do rendimento dessas reações desconsiderou-se a massa adicionada dos compostos funcionais. Dessa forma, conversões acima de 1 indicariam a incorporação de tais componentes. Observou-se para as partículas contendo 10 e 50% GMA funcionalizadas com benzilamina e para as partículas à base de 10 e 50% PFS funcionalizadas com tiofenol conversões acima de 1, indicando que ou tais compostos não foram removidos durante o processo de secagem ou foram realmente incorporados às cadeias poliméricas. Nota-se também que os rendimentos obtidos foram próximos. Apenas as reações com 50% GMA funcionalizada com benzilamina e tiofenol exibiram elevados rendimentos, acima de 80%. É importante salientar que esses resultados são apenas indícios de que houve reação de funcionalização com alguns grupamentos.

Os diâmetros médios das partículas obtidas ao final de cada reação são apresentados nas Tabela 38 e 39. No entanto, com o objetivo de facilitar a comparação entre as diferentes partículas produzidas, são mostradas as Figuras 86 e 87.

**Tabela 37.** Conversão e rendimento das reações de funcionalização *in situ*.

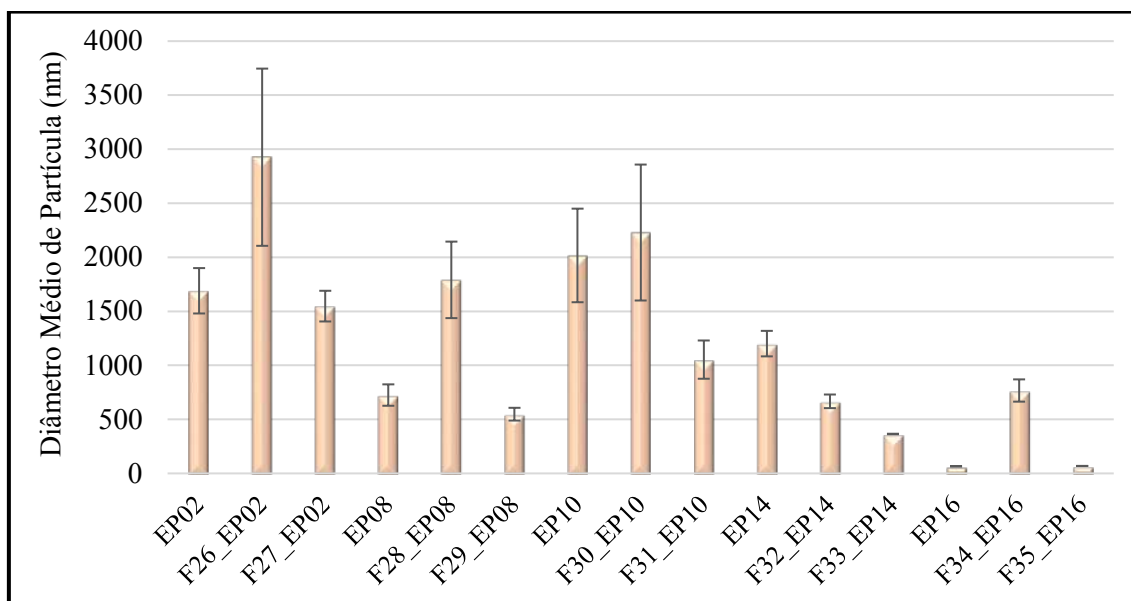
Reação	Legenda	Conversão (Antes da adição do composto funcional)	Conversão_2 (Após a adição do composto funcional)	Rendimento (%)
EP05	IS (0%GMA; Benzilamina)	0.92	- <sup>1</sup>	57.6
EP06	IS (0%GMA; Benzilamina;=EP05)	0.94	- <sup>1</sup>	67.7
EP18	IS (10%GMA; Benzilamina)	0.69	1.11	59.6
EP19	IS (50%GMA; Benzilamina)	0.79	1.41	85.9
EP20	IS (10%GMA; Tiofenol)	0.69	0.82	66.3
EP21	IS (50%GMA; Tiofenol)	0.70	0.56	86.2
EP22	IS (10%PFS; Benzilamina)	0.87	0.72	56.9
EP23	IS (50%PFS; Benzilamina)	0.78	0.99	54.1
EP24	IS (10%PFS; Tiofenol)	0.85	1.37	70.6
EP25	IS (50%PFS; Tiofenol)	0.31	1.40	- <sup>1</sup>

<sup>1</sup> As análises não puderam ser realizadas.

Ao observar a Figura 86, percebe-se que o aumento de GMA (EP08 para EP10) no meio reacional provocou um aumento do diâmetro médio das partículas, resultado de uma maior aglomeração das partículas. Efeito contrário foi observado com o aumento de PFS no meio reacional (EP 14 para EP 16). Além disso, é possível notar para a maior parte das reações que o processo de funcionalização ou não alterou ou provocou um aumento do diâmetro médio de partícula. No entanto, observa-se que inúmeras reações resultaram em partículas micrométricas. Dessa forma, ou os compostos funcionais adicionados ao meio reacional (benzilamina e tiofenol) provocam uma maior aglomeração de partículas durante a própria reação ou a aglomeração é resultado do processo de secagem das partículas. Assim, novas análises são necessárias para avaliar em que etapa ocorre a aglomeração tais materiais. De qualquer forma, em todos os casos foram obtidas partículas muito finas e indicativas da ocorrência de reações em emulsão.

**Tabela 38.** Diâmetro médio das partículas produzidas nas reações de funcionalização pós-polimerização.

Reações	Legenda	Diâmetro Médio de Partícula (nm)
EP02	P(S-co-DVB)	1690 ± 210
F26	PP (EP02; 0%; Benzilamina)	2926 ± 820
F27	PP (EP02; 0%; Tiofenol)	1548 ± 142
EP08	10%GMA	725 ± 99
F28	PP (EP08;10%GMA;Benzilamina )	1791 ± 354
F29	PP (EP08;10%GMA; Tiofenol)	548 ± 59
EP10	50%GMA	2017 ± 433
F30	PP (EP10; 50%GMA; Benzilamina)	2229 ± 629
F31	PP (EP10; 50%GMA; Tiofenol)	1053 ± 177
EP14	10%PFS=EP11	1201 ± 118
F32	PP (EP14; 10%PFS; Benzilamina)	667 ± 63
F33	PP (EP14; 10%PFS; Tiofenol)	365 ± 2
EP16	50%PFS = EP13	66 ± 0
F34	PP (EP16; 50%PFS; Benzilamina )	767 ± 103
F35	PP (EP16;50%PFS; Tiofenol)	69 ± 0

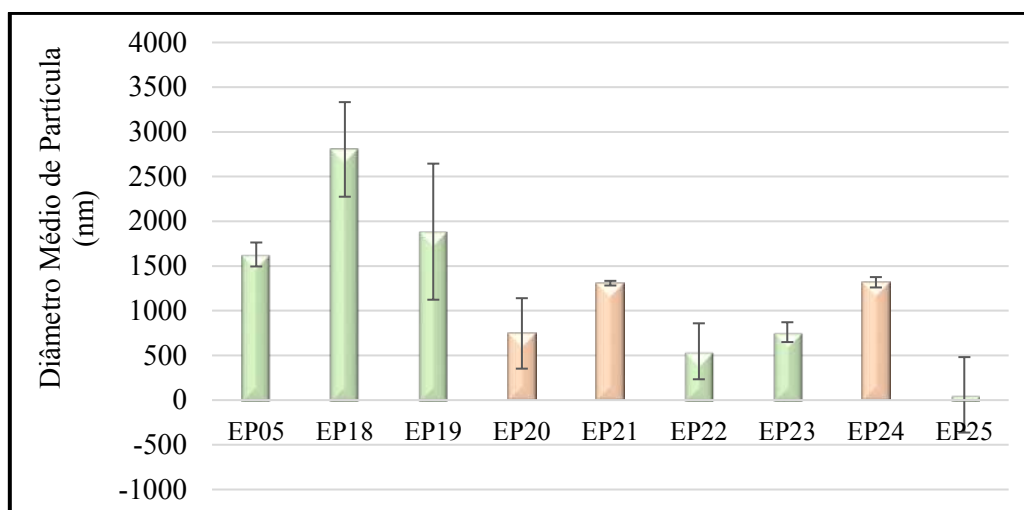


**Figura 86.** Diâmetro médio das partículas produzidas nas reações de funcionalização pós-polimerização.

Na Figura 87 são mostrados os diâmetros médios das partículas funcionalizadas *in situ*. É possível observar que partículas de menor diâmetro foram obtidas a partir do emprego de PFS como comonômero. A reação em que 50% de PFS foi empregado como comonômero e tiofenol como composto funcional resultou em partículas com os menores diâmetros. Ao comparar as duas estratégias de funcionalização, percebe-se que ambas as estratégias resultaram, na maior parte das reações, em partículas de mesmo diâmetro. Dessa forma, a estratégia de funcionalização, aparentemente, não afeta o tamanho final das partículas produzidas.

**Tabela 39.** Diâmetro médio das partículas produzidas nas reações de funcionalização *in situ*.

Reação	Legenda	Diâmetro Médio de Partícula (nm)
EP05	IS (0%GMA; Benzilamina)	1629 ± 134
EP18	IS (10%GMA; Benzilamina)	2804 ± 761
EP19	IS (50%GMA; Benzilamina)	1884 ± 394
EP20	IS (10%GMA; Tiofenol)	746 ± 26
EP21	IS (50%GMA; Tiofenol)	1308 ± 313
EP22	IS (10%PFS; Benzilamina)	546 ± 111
EP23	IS (50%PFS; Benzilamina)	760 ± 58
EP24	IS (10%PFS; Tiofenol)	1318 ± 422
EP25	IS (50%PFS; Tiofenol)	59 ± 1



**Figura 87.** Diâmetro médio das partículas produzidas nas reações de funcionalização *in situ*.



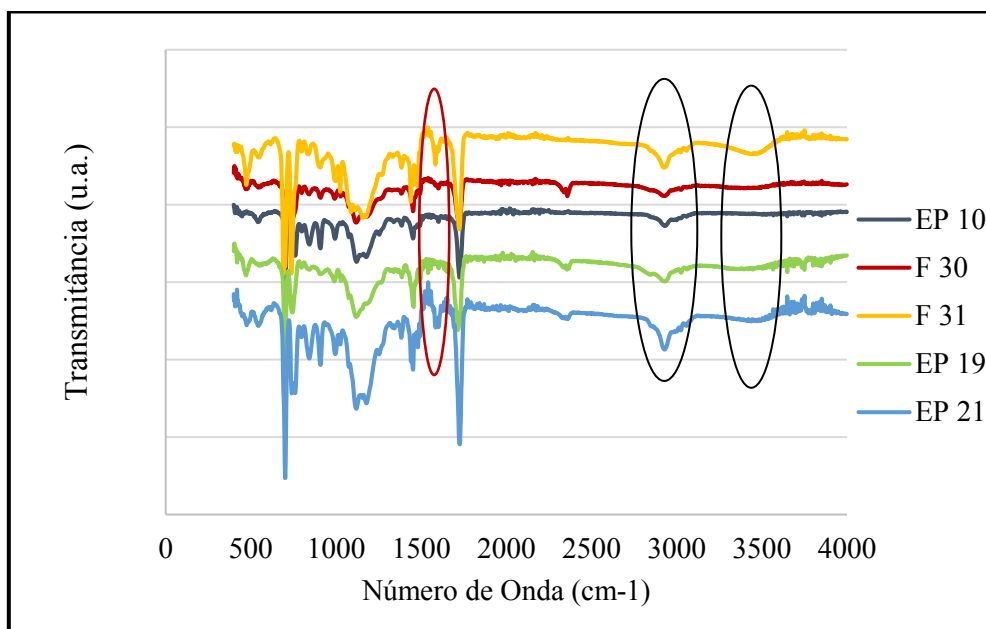
Análises de FTIR foram conduzidas visando a identificar diferenças na composição das diferentes matrizes poliméricas produzidas. Com o objetivo de identificar mais claramente a inserção dos grupamentos funcionais, foram selecionadas as partículas que continham maior teor de comonômeros reativos (50% GMA e 50% PFS). Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 88 e 89.

Na Figura 88 são apresentados os resultados correspondentes às resinas poliméricas à base de GMA obtidas por ambas as estratégias de funcionalização. É possível observar nas reações em que o tiofenol foi empregado, um leve aumento na intensidade da banda correspondente às vibrações C-H presentes no anel aromático de tal composto funcional (em torno de  $3000\text{ cm}^{-1}$ ) (ROMÃO *et al.*, 2003). Observa-se também um abaulamento das curvas em torno de ( $3500\text{ cm}^{-1}$ ). Sabe-se que, após a reação de funcionalização, um grupamento hidroxila deve aparecer na cadeia polimérica e que a vibração O-H ocorre no número de onda mencionado (ROMÃO *et al.*, 2003). Percebe-se também a presença de uma nova banda nas partículas funcionalizadas (em torno de  $1400\text{ cm}^{-1}$ ). Tal banda é correlacionada às deformações angulares na ligação CH<sub>3</sub>-S- (ROMÃO *et al.*, 2003). Dessa forma, esse resultado é um indicativo da funcionalização bem-sucedida desses materiais por ambas as estratégias.

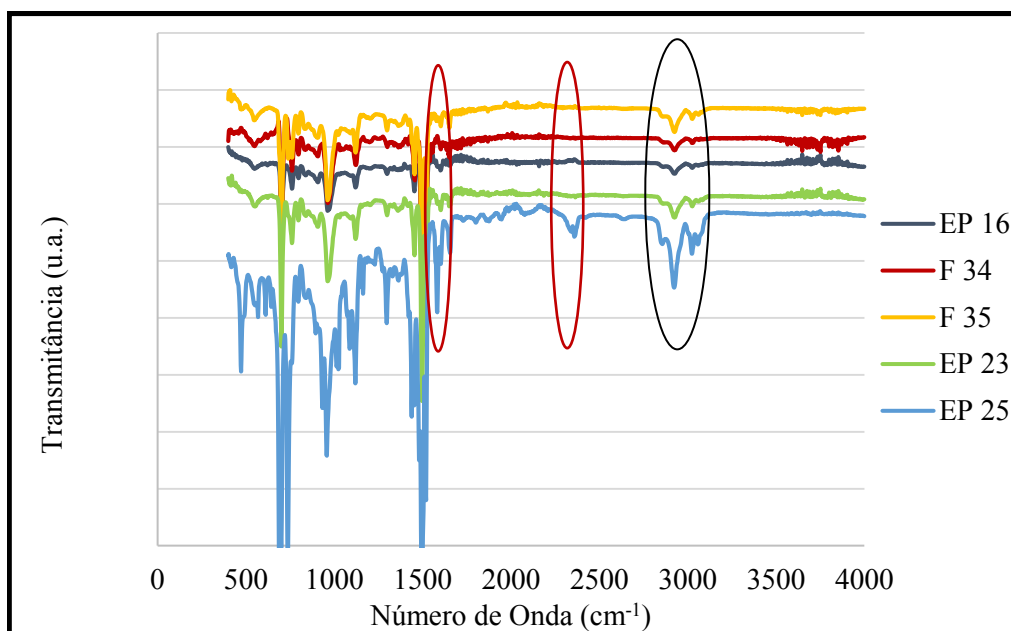
Contudo, nenhuma modificação foi percebida nos espectros das partículas funcionalizadas com benzilamina. Possivelmente, como as vibrações correspondentes ao átomo de amina muitas vezes coincidem com as vibrações dos demais grupamentos da cadeia polimérica, uma análise mais detalhada se faz necessária com o objetivo de avaliar se houve abertura do anel epóxido empregando benzilamina nas condições de reação por ambas as estratégias.

Os resultados correspondentes à funcionalização das partículas à base de PFS são mostrados na Figura 89. Ao analisar os espectros obtidos, percebe-se que, apesar das diferentes reações conduzidas, resultados semelhantes foram obtidos. Contudo, para a reação de funcionalização *in situ* empregando tiofenol, observou-se o aparecimento da mesma banda descrita anteriormente, correspondente às deformações na ligação CH<sub>3</sub>-S- (em torno de  $1400\text{ cm}^{-1}$ ). Além disso, a banda correspondente às vibrações C-H presentes no anel aromático do tiofenol (em torno de  $3000\text{ cm}^{-1}$ ) também se intensificou após a funcionalização. Ademais, uma nova banda apareceu em torno de  $2500\text{ cm}^{-1}$ . Tal banda corresponde ao estiramento da ligação S-H (ROMÃO *et al.*, 2003). Dessa forma, a reação de *Click Chemistry* entre os átomos de flúor e o tiofenol é evidenciada nas reações de

funcionalização *in situ* nas condições operacionais empregadas. Contudo, para as demais reações é necessária uma análise mais detalhada, uma vez que a possível sobreposição de bandas na mesma região do espectro dificulta a identificação de compostos funcionais específicos.



**Figura 88.** Resultados de FTIR das partículas à base de 50% GMA funcionalizadas por ambas as estratégias.

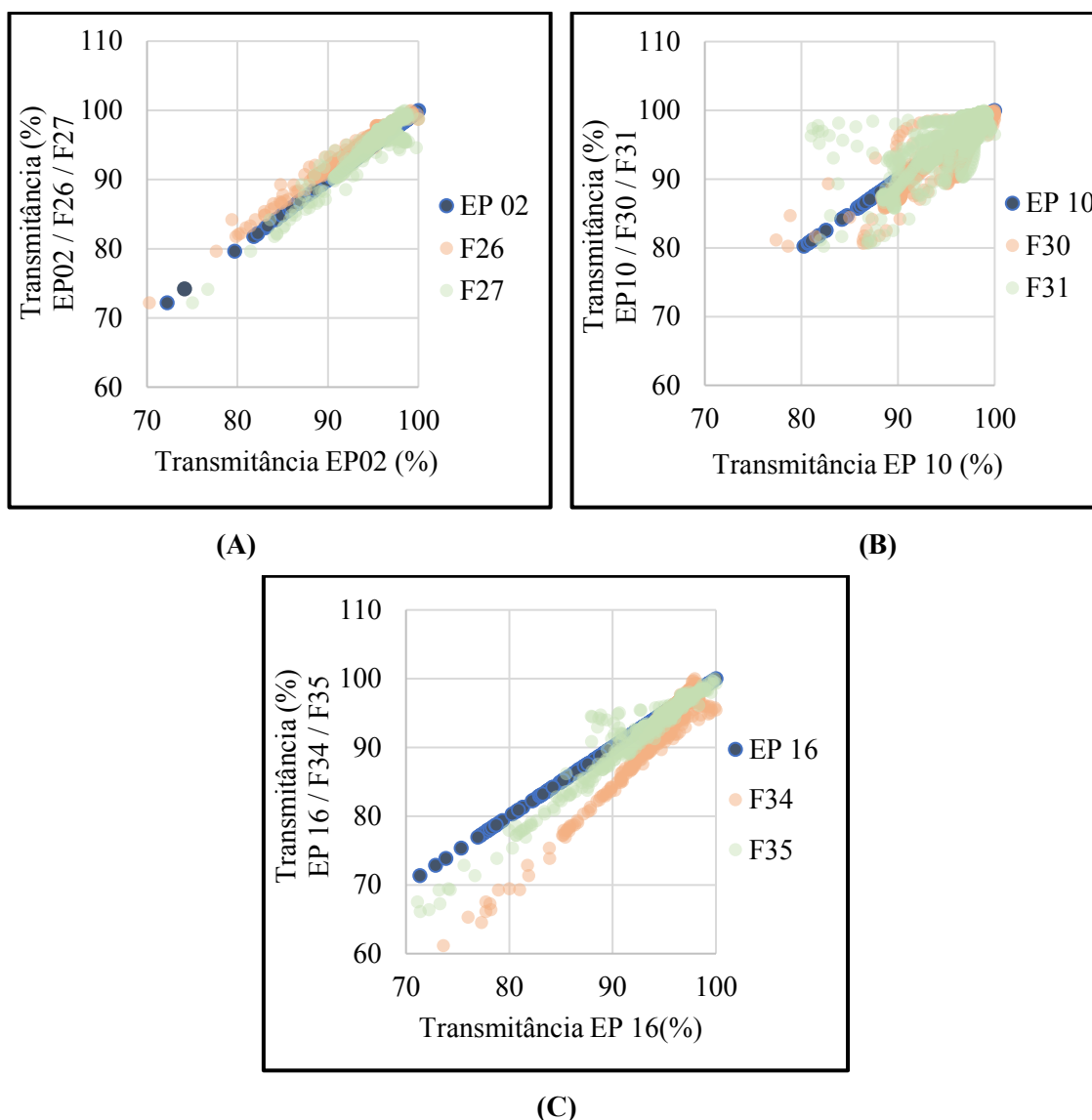


**Figura 89.** Resultados de FTIR das partículas à base de 50% de PFS funcionalizadas por ambas as estratégias.

De forma a facilitar a comparação das possíveis modificações na composição em função dos processos de funcionalização, são mostradas as Figuras 90 e 91. Na Figura 90 são apresentados os resultados obtidos para as partículas produzidas a partir das reações de funcionalização pós-polimerização. Na Figura 90 A é mostrado que as partículas de P(S-co-DVB) submetidas às reações de funcionalização com benzilamina e tiofenol não exibam qualquer modificação na composição, apresentando os mesmos resultados encontrados para as partículas de P(S-co-DVB) antes da funcionalização, como esperado. Dessa forma, o processo de lavagem e secagem das partículas ao final do processo também se mostrou eficiente, havendo a eliminação eficiente dos compostos funcionais, uma vez que não há grupamentos reativos disponíveis na matrizes de P(S-co-DVB) para reação.

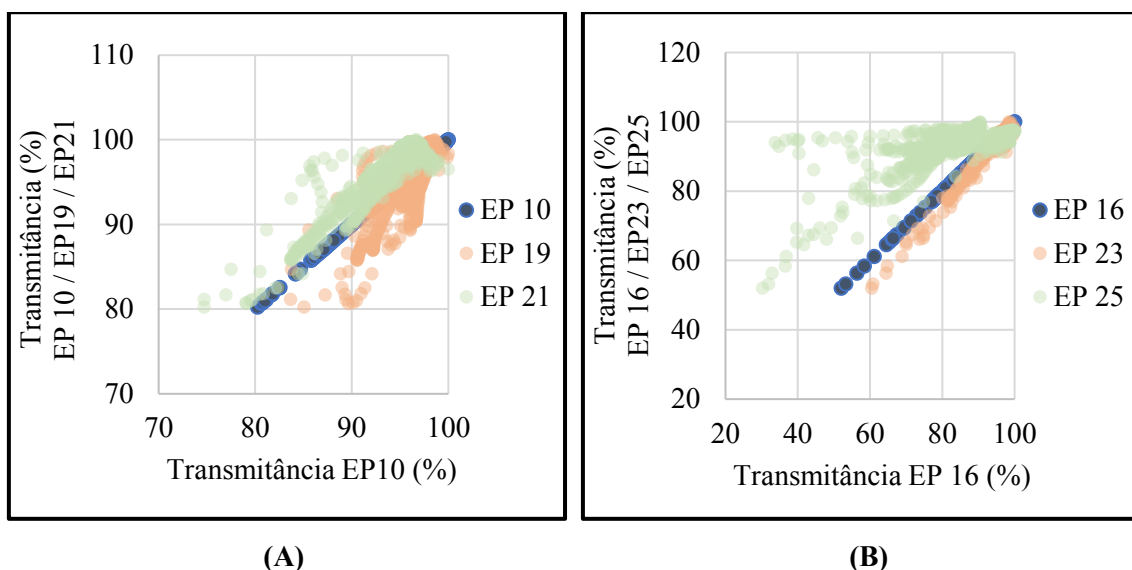
Ao analisar a Figura 90 B, percebe-se claramente a reação de funcionalização entre às partículas de GMA e tiofenol, como discutido anteriormente. Ademais, é identificada uma mudança na composição do material polimérico quando a benzilamina também foi adicionada ao meio reacional, indicando que houve reação de abertura do anel epóxido com a benzilamina e com o tiofenol. Na Figura 90 C, nota-se uma mudança mais pronunciada nas matrizes à base de PFS quando o tiofenol foi empregado na reação de funcionalização; resultado também mostrado anteriormente. Já a reação com a benzilamina resultou no mesmo perfil que as partículas de P(S-co-DVB-co-PFS), sem funcionalização (a inclinação da curva pode ocorrer apenas por uma mudança na linha de base). Dessa forma, aparentemente, reações de funcionalização pós-polimerização ocorreram entre as diferentes matrizes poliméricas, à base de GMA e à base de PFS, e os compostos funcionais, tiofenol e benzilamina. Apenas a reação de *Click Chemistry* entre PFS e a benzilamina não pôde ser percebida.

Análise similar foi realizada para as partículas funcionalizadas *in situ*. Os resultados são mostrados na Figura 91. É possível notar que ocorreu uma mudança pronunciada nas curvas de GMA quando partículas de P(S-co-DVB-co-GMA) foram submetidas a reações de funcionalização com tiofenol e benzilamina. Como percebido a partir dos espectros de FTIR, as reações de funcionalização *in situ* para as matrizes à base de 50% PFS só ocorreram quando o tiofenol foi adicionado como composto funcional.



**Figura 90.** Correlação entre as transmitâncias dos diferentes espectros de FTIR: **(A)** Partículas sem grupamentos de GMA ou PFS submetidas a funcionalização pós-polimerização; **(B)** Partículas contendo 50% de GMA submetidas à funcionalização pós-polimerização; **(C)** Partículas contendo 50% de PFS submetidas à funcionalização pós-polimerização.

Esses resultados indicam a eficácia dos processos de funcionalização pós-polimerização e *in situ*. Ambas as estratégias se mostraram eficientes para a funcionalização de partículas à base de GMA e PFS empregando o tiofenol como composto funcional e para a funcionalização de matrizes de GMA com benzilamina. Ambas as estratégias se mostraram igualmente inadequadas para a funcionalização das partículas à base de PFS com benzilamina.



**Figura 91.** Correlação entre as transmitâncias dos diferentes espectros de FTIR: **(A)** Partículas contendo 50% de GMA funcionalizadas *in situ*; **(B)** Partículas contendo 50% de PFS funcionalizadas *in situ*.

As áreas específicas das partículas funcionalizadas, pós-polimerização e *in situ*, também foram avaliadas e são mostradas nas Tabelas 40 e 41. É possível perceber que o tipo de comonômero empregado na reação de polimerização é determinante para a obtenção de partículas de maior área específica. As reações em que GMA foi empregado resultaram em partículas de menor área, quando comparadas às partículas de PFS, possivelmente em função da maior aglomeração das partículas produzidas, como discutido anteriormente. Foi possível notar também que os grupamentos funcionais adicionados após ou durante a reação de polimerização provoca uma redução da área específica das partículas obtidas, provavelmente em função de uma maior desestabilização da emulsão e uma maior aglomeração das partículas. Vale salientar que, como mencionado anteriormente, tal aglomeração pode ocorrer também durante o processo de secagem das partículas.

É importante ressaltar que o objetivo principal de tais reações de síntese, empregando diferentes teores de comonômeros reativos, e de funcionalização, utilizando grupamentos funcionais distintos, é a produção de suportes poliméricos com propriedades de superfície diferenciadas. Assim, por fim, foram realizadas análises para inferir o grau de hidrofobicidade das partículas produzidas. Os resultados de ângulo de contato são mostrados na Tabela 42 e 43.

**Tabela 40.** Área específica das partículas produzidas a partir das reações de funcionalização pós-polimerização.

Reações	Legenda	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)
EP02	P(S-co-DVB)	159,1
EP10	50%GMA	58,1
F30	PP (EP10; 50%GMA; Benzilamina)	58,0
F31	PP (EP10; 50%GMA; Tiofenol)	34,0
EP16	50%PFS = EP13	323,9
F34	PP (EP16; 50%PFS; Benzilamina)	139,6
F35	(EP16;50%PFS; Tiofenol)	125,2

**Tabela 41.** Área específica obtida para as partículas produzidas a partir das reações de funcionalização *in-situ*.

Reação	Legenda	Área Específica (m <sup>2</sup> /g)
EP19	IS (50%GMA; Benzilamina)	35,6
EP21	IS (50%GMA; Tiofenol)	39,3
EP23	IS (50%PFS; Benzilamina)	231,5
EP25	IS (50%PFS; Tiofenol)	- <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Valor de área específica não pôde ser detectado.

**Tabela 42.** Ângulo de contato obtido para as partículas produzidas a partir das reações de funcionalização pós-polimerização.

Reações	Legenda	Ângulo de Contato (°)
EP02	P(S-co-DVB)	99,8 ± 0,1
F26	PP (EP02; 0%; Benzilamina)	102,4 <sup>1</sup>
F27	PP (EP02; 0%; Tiofenol)	104,2 <sup>1</sup>
EP10	50%GMA	28,5 ± 11,4
F30	PP (EP10; 50%GMA; Benzilamina)	81,1 ± 5,2
F31	PP (EP10; 50%GMA; Tiofenol)	100,0 ± 2,2
EP16	50%PFS = EP13	126,0 <sup>1</sup>
F34	PP (EP16; 50%PFS; Benzilamina )	128,5 ± 3,2
F35	PP (EP16; 50%PFS; Tiofenol)	115,9 ± 4,0

<sup>1</sup> Não foi possível realizar duplicatas dessas análises.

Ao observar os resultados encontrados para as partículas funcionalizadas pós-polimerização, na Tabela 42, é possível notar que as partículas à base de GMA são mais hidrofílicas (em função da presença dos grupamentos éster e epóxido), enquanto as partículas à base de PFS são mais hidrofóbicas (em decorrência da presença dos átomos de flúor presentes nesse comonômero). Dessa forma, ao considerar as partículas de P(S-co-DVB) como referência, é observado que foi possível sintetizar matrizes mais hidrofílicas e mais hidrofóbicas. Além disso, há indícios de que as reações de *Click Chemistry* entre as partículas de GMA e ambos os compostos funcionais (tiofenol e benzilamina) ocorreram, uma vez que há o aumento do ângulo de contato após as reações de funcionalização. No entanto, resultados semelhantes foram obtidos quando as partículas à base de PFS foram empregadas nas reações de funcionalização com benzilamina. Nota-se que a adição do tiofenol provoca uma diminuição do grau de hidrofobicidade das partículas, possivelmente em função da substituição dos átomos de flúor.

Ao analisar as reações de funcionalização *in situ*, nota-se que, para as matrizes com 10% de GMA e 10% PFS, ângulos de contato semelhantes foram obtidos. Resultados similares também foram encontrados após a adição dos compostos funcionais. Contudo, para as matrizes com 50% de GMA e 50%PFS, novamente percebe-se o caráter mais hidrofóbico das partículas de PFS. Além disso, nota-se que reações de funcionalização ocorreram empregando tanto a benzilamina quanto o tiofenol, pois compostos mais hidrofóbicos foram obtidos ao final das respectivas reações com as partículas à base de GMA. Em contrapartida, as reações de *Click Chemistry* entre os grupamentos de PFS e ambos os compostos funcionais foram comprovadas, já que ocorreu o aumento do grau de hidrofílicidade das partículas após a inserção desses componentes na matriz polimérica.

Dessa forma, é evidenciada a eficiência de ambas as estratégias de funcionalização, uma vez que compostos poliméricos com propriedades diferenciadas, inclusive de superfície, foram produzidos após as reações de funcionalização (com tiofenol e benzilamina), indicando que ambas as estratégias podem ser empregadas na funcionalização de partículas casca-núcleo. Apenas a funcionalização de matrizes à base de PFS em reações de funcionalização pós-polimerização, empregando benzilamina, aparentemente não ocorreu de forma eficiente.

**Tabela 43.** Ângulo de contato obtido para as partículas produzidas a partir das reações de funcionalização *in situ*.

Reação	Legenda	Ângulo de Contato (°)
EP02	P(S-co-DVB)	99,8 ± 0,1
EP18	IS (10%GMA; Benzilamina)	99,6 ± 2,4
EP20	IS (10%GMA; Tiofenol)	91,5 ± 11,8
EP10	50%GMA	28,5 ± 11,4
EP19	IS (50%GMA; Benzilamina)	57,5 <sup>1</sup>
EP21	IS (50%GMA; Tiofenol)	96,3 ± 3,0
EP22	IS (10%PFS; Benzilamina)	95,9 ± 0,3
EP24	IS (10%PFS; Tiofenol)	89,5 ± 0,0
EP16	50%PFS = EP13	126,0 <sup>1</sup>
EP23	IS (50%PFS; Benzilamina)	113,1 ± 4,0
EP25	IS (50%PFS; Tiofenol)	87,6 <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Não foi possível realizar duplicatas dessas análises.

#### 4.4. Conclusões Parciais

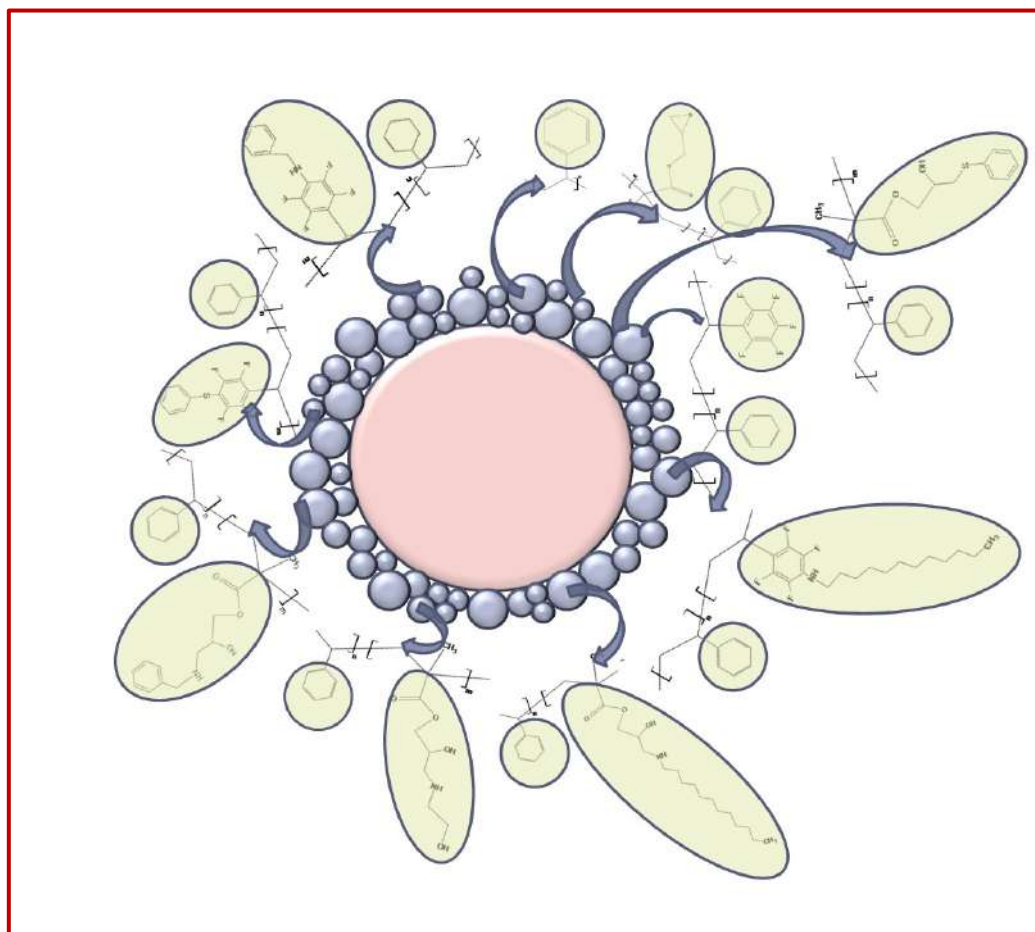
Por tudo que foi apresentado, foi possível observar que diferentes materiais poliméricos, contendo diferentes teores de GMA e PFS, foram produzidos com êxito. Cada um desses polímeros foi empregado em diferentes reações de funcionalização, sendo produzidos diferentes materiais poliméricos contendo diferentes grupamentos funcionais. Inúmeras análises indicaram a ocorrência das reações de *Click Chemistry* entre os diferentes compostos funcionais e as matrizes poliméricas à base de GMA. Para os materiais poliméricos à base de PFS, só foi evidenciada a reação de funcionalização quando o tiofenol foi empregado.

Com relação especificamente às etapas de síntese das nanopartículas poliméricas, percebeu-se que as reações em que GMA foi empregado resultaram em partículas de menor área, quando comparadas às partículas de PFS. Foi possível notar também que os grupamentos funcionais adicionados após ou durante a reação de polimerização provocaram uma redução da área específica das partículas obtidas. Percebeu-se também a eficiência de ambas as estratégias de funcionalização, uma vez que compostos poliméricos com propriedades distintas de superfície foram produzidos após as reações de funcionalização, indicando que ambas as estratégias podem ser empregadas para



síntese de partículas casca-núcleo funcionalizadas. Apenas a funcionalização das matrizes de PFS em reações de funcionalização pós-polimerização empregando benzilamina, aparentemente, não ocorreu de forma eficiente.

Acredita-se que, ao empregar as reações de funcionalização descritas ao longo do trabalho nos processos de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas, novos suportes possam ser produzidos, como mostrado na Figura 92.



**Figura 92.** Suportes poliméricos que se deseja sintetizar nas próximas etapas do trabalho.

A síntese de polímeros *commodities* é largamente explorada no país. Contudo, o desenvolvimento da área de Engenharia de Suportes busca aprofundar estudos, desenvolver polímeros mais sofisticados e contendo grupamentos químicos de interesse na estrutura, procurando estudar também o escalonamento de tais processos. Assim, almeja-se desenvolver suportes mais eficientes e biocatalisadores promissores.

## *Capítulo V*

# Conclusão

Por tudo o que foi apresentado e discutido, é possível perceber a evolução satisfatória que o presente trabalho apresentou na direção de produzir partículas poliméricas para serem posteriormente empregadas como suporte na síntese de biocatalisadores. Suportes poliméricos obtidos ao final de reações nas quais a alimentação da mistura monomérica foi realizada em tempos iniciais da reação apresentaram valores de área específica e porosidade nunca antes obtidos a partir deste sistema de polimerização (ao redor de 50 m<sup>2</sup>/g).

A partir dos experimentos realizados, percebeu-se também a necessidade de adicionar divinilbenzeno como comonômero para a obtenção de partículas com áreas específicas e porosidades mais pronunciadas. Ademais, foi possível perceber que a adição de divinilbenzeno aumenta a resistência mecânica das partículas poliméricas produzidas. Notou-se também que diversas características morfológicas das partículas casca-núcleo são afetadas da mesma forma, seguindo o mesmo comportamento, independentemente da composição química do sistema polimérico.

Dentre as diferentes estratégias implementadas com o propósito de obter partículas poliméricas com características adequadas para serem empregadas como suporte, ressalta-se a reação na qual houve a alimentação de uma miniemulsão, que resultou em partículas emulsificadas mais estáveis, diminuindo a eficiência de recobrimento dos núcleos poliméricos e, conseqüentemente, a geração de suportes com menores áreas específicas. Aparentemente, a estratégia mais eficiente envolveu a alimentação da emulsão em instantes iniciais da reação em suspensão, resultando em partículas com áreas específicas e porosidades expressivas, como mencionado anteriormente.

O estudo de escalonamento do processo de polimerização em suspensão e emulsão simultâneas foi conduzido de forma satisfatória, apresentando resultados promissores. Novos suportes com morfologia casa-núcleo, apresentando composições distintas, foram produzidos em escala piloto, sendo obtido ao final de cada batelada aproximadamente 1 kg de material polimérico. No entanto, parece claro que a

composição eventualmente desenvolvida no laboratório precisa ser readaptada nas maiores unidades para permitir a produção de materiais com características similares.

Com base em todos os resultados obtidos na etapa de imobilização enzimática, ficou evidente, inicialmente, a eficácia da utilização de partículas com morfologia casca-núcleo no processo de imobilização de enzimas. O emprego, até mesmo, das nanopartículas de elevada área específica, formadoras da casca polimérica, resultou em biocatalisadores menos ativos (ao analisar as reações de hidrólise e esterificação) que os produzidos a partir das partículas casca-núcleo.

É importante destacar também que os biocatalisadores, sintetizados a partir das partículas casca-núcleo produzidas em larga escala, apresentaram atividades mais elevadas que o biocatalisador comercial, em reações de hidrólise, e foram tão ativos quanto à *Novozym 435*, ao analisar as reações de esterificação. Percebeu-se também que todos os suportes produzidos resultaram em biocatalisadores com melhores desempenhos (avaliando-se as atividades de hidrólise e esterificação) que o biocatalisador produzido a partir do suporte comercial Accurel.

Além disso, o emprego do suporte com as maiores área específica e porosidade e o aumento concomitante da carga enzimática no início de processo de imobilização resultou em biocatalisadores com expressiva atividade ( $A_{hid} = 34,7 \pm 3,8$ ;  $A_{est} = 3564,6 \pm 581$ ), sendo mais ativos que a *Novozym 435* ( $A_{hid} = 7,6 \pm 1,8$ ;  $A_{est} = 2384,7 \pm 307,2$ ). Ademais, foi observado que ainda assim o grau de saturação de suporte pela enzima estudada ainda não tinha sido atingido, estimulando o uso de cargas enzimáticas mais elevadas.

Com base nos resultados encontrados durante as etapas de funcionalização, percebeu-se que diferentes materiais poliméricos, contendo diferentes teores de GMA e PFS, foram produzidos com êxito. Além disso, empregando-se as condições operacionais descritas no trabalho, foi possível sintetizar materiais poliméricos distintos, contendo diferentes grupamentos funcionais na estrutura. Pôde-se notar, contudo, que as reações de funcionalização envolvendo a abertura do anel epóxido eram mais evidentes, enquanto a ocorrência das reações do tipo *Click* com os grupamentos do monômero PFS só era percebida, de forma clara, quando o tiofenol era empregado como composto funcional.

Ao analisar a etapa de síntese das nanopartículas em emulsão, percebeu-se que partículas de maior área eram obtidas nas reações em que PFS era empregado como

comonômero, ao comparar com as partículas à base de um copolímero de GMA. Foi possível notar também a eficiência de ambas as estratégias de funcionalização, uma vez que compostos poliméricos com propriedades distintas foram produzidos após as reações, indicando que ambas as estratégias podiam ser empregadas para funcionalização de nanopartículas poliméricas.

Foi possível perceber, então, que suportes poliméricos diversos foram produzidos, inclusive em larga escala, estimulando uma área pouco desenvolvida no país, a área de Engenharia de Suportes. Tais partículas foram empregadas com êxito para a síntese de biocatalisadores que apresentaram desempenho similar ou superior ao de biocatalisadores comerciais. Estudos envolvendo a funcionalização das matrizes poliméricas foram conduzidos com eficiência, resultando na síntese de nanopartículas com grupamentos funcionais ainda mais diferenciados na superfície.

### **5.1. Sugestões**

Para trabalhos futuros, sugere-se, inicialmente, adotar novas estratégias de polimerização, de forma a aumentar ainda mais a área específica e a porosidade dos suportes produzidos. Uma sugestão inicial seria a substituição do PVA por outro agente de suspensão, buscando facilitar a adesão das nanopartículas geradas na emulsão ao redor dos núcleos, aumentando o grau de cobertura.

Apesar dos resultados não tão satisfatórios obtidos para a reação em que uma miniemulsão foi alimentada ao reator, sugere-se que novas condições experimentais sejam analisadas, explorando de forma mais aprofundada essa estratégia de polimerização. Assim, suportes com áreas mais expressivas poderão ser eventualmente sintetizados.

Novos estudos devem ser realizados envolvendo a síntese das partículas casca-núcleo contendo grupamentos do tipo epóxido ou átomos de flúor na superfície. Dessa forma, novos grupamentos funcionais e estratégias de funcionalização poderão ser adotadas, objetivando a síntese de suportes mais eficientes.

Propõe-se ainda novos estudos para determinar o grau de saturação enzimática dos suportes poliméricos produzidos, buscando sintetizar biocatalisadores mais ativos.

Além disso, deve ser avaliado também o número de ciclos em que os biocatalisadores podem ser empregados sem perda significativa da atividade.

Outros mecanismos de imobilização também devem ser explorados ao empregar as partículas poliméricas funcionalizadas. Dessa forma, é possível que biocatalisadores mais estáveis sejam produzidos. Estudos também deve ser realizados com o objetivo de determinar de forma mais aprofundada as estabilidades química e mecânica dos biocatalisadores produzidos. Um estudo englobando a síntese dessas enzimas imobilizadas em larga escala e avaliando os reatores mais adequados para o emprego de tais biocatalisadores também deveria ser conduzido. Uma análise econômica envolvendo a síntese dos biocatalisadores enzimática também se faz necessária.

Finalmente, estudos devem ser realizados com o objetivo de expandir e avaliar a aplicação dos biocatalisadores produzidos em outros setores. Novamente, é importante destacar que este trabalho está inserido em um contexto mais amplo, uma vez que se objetiva empregar tais biocatalisadores enzimáticos não apenas nas reações descritas neste trabalho, mas em processos biocatalíticos diversos, como na síntese de fármacos, biolubrificantes, biodiesel, ésteres de glicerol e ésteres aromáticos. Assim, almeja-se desenvolver suportes mais eficientes e biocatalisadores mais promissores.

## Referências Bibliográficas

- ALVES, J. S., GARCIA-GALAN, C., SCHEIN, M. F., SILVA, A. M., BARBOSA, O., AYUB, M. A. Z., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C., 2014, “Combined Effects of Ultrasound and Immobilization Protocol on Butyl Acetate Synthesis Catalyzed by CALB”, *Molecules*, v. 19, pp. 9562 - 9576.
- ANDERSON, E. M., LARSSON, K. M., KIRK, O., 1998, “One Biocatalyst -\* Many Applications: The Use of *Candida antarctica* B-Lipase in Organic Synthesis”, *Biocatalysis and biotransformation*, v. 16, pp. 181 - 204.
- ANÔNIMO, 2017, WEB OF KNOWLEDGE, Disponível em: [https://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search\\_mode=CitationReport&SID=1Fi1GFJAa5pdTbJralR&page=1&cr\\_pqid=3&viewType=summary&colName=WOS](https://apps.webofknowledge.com/CitationReport.do?product=WOS&search_mode=CitationReport&SID=1Fi1GFJAa5pdTbJralR&page=1&cr_pqid=3&viewType=summary&colName=WOS). Acesso em 21 de Jul. 2017.
- ARROYO, M., SANCHÉZ-MONTERO, J. M., SINISTERRA, J. V., 1998, “Stabilization of lipase B from *Candida antarctica* by immobilization on different supports”, *Progress in Biotechnology*, v. 15, pp. 565 - 570.
- ARSHADY, R., 1992, “Suspension, emulsion, and dispersion polymerization: A methodological survey”, *Colloid and Polymer Science*, v. 270, pp. 717 - 732.
- ASUA, J. M., 2002, “Miniemulsion polymerization”, *Progress in Polymer Science*, v. 27, pp. 1283 - 1346.
- ATANASOV, V., BURGER, M., LYONNARD, S., PORCAR, L., KERRES, J., 2013, “Sulfonated poly(pentafluorostyrene): Synthesis & characterization”, *Solid State Ionics*, v. 252, pp. 75 - 83.

- BAI, F., YANG, X., ZHAO, Y., HUANG, W., 2005, "Synthesis of core-shell microspheres with active hydroxyl groups by two-stage precipitation polymerization", *Polymer International*, v. 54, pp. 168 - 174.
- BALCÃO, V. M., PAIVA, A. L., MALCATA, F. X., 1996, "Bioreactors with immobilized lipases: State of the art", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 18, pp. 392 - 416.
- BARBOSA, O., TORRES, R., ORTIZ, C., FERNADEZ-LAFUENTE, R., 2012, "Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*", *Process Biochemistry*, v. 47, pp. 1220 - 1227.
- BASSO, A., FROMENT, L., HESSELER, M., SERBAN, S., 2013, "New highly robust divinyl benzene/acrylate polymer for immobilization of lipase CALB", *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 115, pp. 468 - 472.
- BASSO, A., HESSELER, M., SERBAN, S., 2016, "Hydrophobic microenvironment optimization for efficient immobilization of lipases on octadecyl functionalised resins", *Tetrahedron*, v. 72, pp. 7323 - 7328.
- BASTIDA, A., SABUQUILLO, P., ARMISEN, P., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., HUQUET, J., GUIBAN, J. M., 1998, "A Single Step Purification, Immobilization, and Hyperactivation of Lipases via Interfacial Adsorption on Strongly Hydrophobic Supports", *Biotechnology and Bioengineering*, v. 58, pp. 486 - 493.
- BECER, C. R., BABIUCH, K., PILZ, D., HORNIG, S., HEINZE, T., GOTTSCHALDT, M., SCHUBERT, U. S., 2009, "Clicking pentafluorostyrene copolymers: synthesis, nanoprecipitation, and glycosylation", *Macromolecules*, v. 42, pp. 2387 - 2394.

- BESTETI, M. D., 2009, *Produção e Caracterização de Partículas Casca-Núcleo Obtidas pela Polimerização Simultânea em Suspensão e Emulsão*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BESTETI, M. D., 2011, *Produção de Partículas Poliméricas com Porosidade Controlada para a Preparação de Biocatalisadores*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BESTETI, M. D., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., 2011, “Production of Core-shell Particles by Combined Semibatch Emulsion/Suspension Polymerizations”, *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 5, pp. 518 - 532.
- BESTETI, M. D., CUNHA, A. G., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., 2014a, “Core/Shell Polymer Particles by Semibatch Combined Suspension/Emulsion Polymerizations for Enzyme Immobilization”, *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 299, pp. 135 - 143.
- BESTETI, M. D., SOUZA JR., F. G., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., 2014, “Production of Core-Shell Polymer Particles-Containing Cardanol by Semibatch Combined Suspension/Emulsion Polymerization”, *Polymer Engineering and Science*, v. 54, pp. 1222 - 1229.
- BOMMARIUS, A. S., SCHWARM, M., DRAUZ, K., 1998, “Biocatalysis to amino acid-based chiral pharmaceuticals—examples and perspectives”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 5, pp. 1 - 11.
- BON, E. P. S., COSTA, R. B., SILVA, M. V. A., FREITAS, F. C., LEITÃO, V. S. F., LACERDA, P. S. B., FERRARA, M. A., 2008, “Mercado e Perspectivas de uso de Enzimas Industriais e Especiais no Brasil”. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., VERMELHO, A. B., PAIVA, C. L. A., ALENCASTRO, R. B., COELHO, R. R. R. (eds), *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, 1ª ed., capítulo 20, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência.



- BRADFORD, M. M., 1976, "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding", *Analytical Biochemistry*, v. 72, pp. 248 - 254.
- BRANDOLINI, A. J., HILLS, D. D., 2000, "NMR Spectra of Polymers and Polymers Additives", 2 ed, New York, USA, Marcel Dekker Inc.
- BRÍGIDA, A. I. S., 2010, *Imobilização de lipases utilizando fibra da casca de coco verde como suporte para aplicações industriais*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- BRUMMELHUIS, N., WECK, M., 2014, "RAFT polymerization of alternating styrene-pentafluorostyrene copolymers", *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, v. 52, pp. 1555 - 1559.
- BUCHERT, J., TENKANEN, M., KANTELINEN, A., VIIKARI, L., 1994, "Application of xylanases in the pulp and paper industry", *Bioresource Technology*, v. 50, pp. 65 - 72.
- CANEVAROLO, S. V., 2004, "Técnicas de Caracterização de Polímeros", 1 ed, São Paulo, Brasil.
- CAO, L., 2005, "Immobilised enzymes: science or art?", *Current Opinion in Chemical Biology*, v. 9, pp. 217 - 226.
- CAO, S., LIU, B., 2009, "The Preparation and Enzyme Immobilization of Hydrophobic Polysiloxane Supports", *Macromolecular Bioscience*, v. 9, pp. 361 - 368.

- CASTRO, H. F., ZANIN, G. M., MORAES, F. F., SÁ-PEREIRA, P., 2008, “Imobilização de Enzimas e sua Estabilização”. In: BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., M. L., VERMELHO, A. B., PAIVA, C. L. A., ALENCASTRO, R. B., COELHO, R. R. R. (eds), *Enzimas em biotecnologia: produção, aplicações e mercado*, 1ª ed., capítulo 06, Rio de Janeiro, Brasil, Editora Interciência.
- CHALAMAIAH, M., DINESH KUMAR, B., HEMALATHA, R., JYOTHIRMAYI, T., 2012, “Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review”, *Food Chemistry*, v. 135, pp. 3020 - 3038.
- CHARTRAIN, M., SALMON, P. M., ROBINSON, D. K., BUCKLAND, B. C., 2000, “Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals”, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 11, pp. 209 - 214.
- CHEN, B., HU, J., MILLER, E. M., XIE, W., CAI, M., GROSS, R. A., 2008, “*Candida antarctica* Lipase B Chemically Immobilized on Epoxy-Activated Micro- and Nanobeads: Catalysts for Polyester Synthesis”, *Biomacromolecules*, v. 9, pp. 463 - 471.
- CHEN, B., MILLER, E. M., MILLER, L., MAIKNER, J. J., GROSS, R. A., 2007a, “Effects of Macroporous Resin Size on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Fraction of Active Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis”, *Langmuir*, v. 23, pp. 1381 - 1387.
- CHEN, B., MILLER, M. E., GROSS, R. A., 2007b, “Effects of Porous Polystyrene Resin Parameters on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Distribution, and Polyester Synthesis Activity”, *Langmuir*, v. 23, pp. 6467 - 6474.
- CHEN, J., WANG, Q., HUA, Z., DU, G., 2007c, “Research and application of biotechnology in textile industries in China”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, pp. 1651 - 1655.

- CIPOLATTI, E. P., VALÉRIO, A., HENRIQUES, R. O., MORITZ, D. E., NINOW, J. L., FREIRE, D. M. G., MANOEL, E. A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., OLIVEIRA, D., 2016, “Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends”, *RSC Advances*, v. 6, pp. 104675 - 104692.
- CIRILO, L., PINTO, M., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., 2014, “Influência do Grau de Hidrofobicidade de Suportes Poliméricos Casca-Núcleo na Imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CAL-B)”, *XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química*, realizado em Florianópolis-SC.
- CUNHA, A. G., 2011, *Resolução Cinética de Derivados de Mio-inositol Catalisada por Lipases*. Ph.D Thesis, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.
- CUNHA, A. G., BESTETI, M. D., MANOEL, E. A., SILVA, A. A. T., ALMEIDA, R. V., SIMAS, A. B. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PINTO, J. C., FREIRE, D. M. G., 2014, “Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica* Effect of the support nature on catalytic properties”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 100, pp. 59 – 67.
- CUNHA, A. G., BESTETI, M. D., MANOEL, E. A., DA SILVA, A. A. T., ALMEIDA, R. V., SIMAS, A. B. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PINTO, J. C., FREIRE, D. M. G., 2014, “Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the support nature on catalytic properties properties”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 100, pp. 59 - 67.
- CUNHA, A. G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., BEVILAQUA, J. V., DESTAIN, J., PAIVA, L. M., FREIRE, D. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., 2008, “Immobilization of *Yarrowia lipolytica* Lipase — a Comparison of Stability of Physical Adsorption and Covalent Attachment Techniques”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 146, pp. 49 - 56.

- CUNHA, A. G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUTARRA, M. L. E., BEVILAQUA, J. V., ALMEIDA, R. V., PAIVA, L. M., FREIRE, D. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUIÓSÁN, J. M., 2009, "Separation and Immobilization of Lipase from *Penicillium simplicissimum* by Selective Adsorption on Hydrophobic Supports", *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 156, pp. 563 - 575.
- DATTA, S., CHRISTENA, L. R., RAJARAM, Y. R. S., 2013, "Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials", *3 Biotech*, v. 3, pp. 1 - 9.
- DOWDING, P. J., VINCENT, B., 2000, "Suspension polymerisation to form polymer beads", *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 161, pp. 259 - 269.
- FAN, X., JIA, X., LI, C., ZHANG, B., ZHANG, H., ZHANG, Q., 2013, "Synthesis of Raspberry-Like Poly(styrene-glycidyl methacrylate) Particles via a One-Step Soap-Free Emulsion Polymerization Process Accompanied by Phase Separation", *Langmuir*, v. 29, pp. 11730 - 11741.
- FERGUSON, C. J., RUSSELL, G. T., GILBERT, R. G., 2002, "Synthesis of latices with polystyrene cores and poly(vinyl acetate) shells. 1. Use of polystyrene seeds", *Polymer*, v. 43, pp. 6371 - 6382.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R., ARMISÉN, P., SABUQUILLO, P., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUIÓSÁN, J. M., 1998, "Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports", *Chemistry and Physics of Lipids*, v. 93, pp. 185 - 197.
- FIGUEIREDO, K. C. S., SALIM, V. M. M., ALVES, T. L. M., *et al.*, 2005, "Lysozyme Adsorption onto Different Supports: A Comparative Study", *Adsorption*, v. 11, pp. 131 - 138.

- FORESTI, M. L., PEDERNERA, M., BUCALA, V., FERREIRA, M. L., 2007, “Multiple effects of water on solvent-free enzymatic esterifications”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 41, pp. 62 - 70.
- FREIRE, D. M. G., 1988, *Imobilização da Amiloglicosidade em Quitina- Caracterização e Testes em reatores contínuos de Leito Expandido*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- FREIRE, D. M. G., CASTILHO, L. R., 2008, “Lipases em biocatálise. In Enzimas Em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado”, 1ª ed.; BON, E. P. S., FERRARA, M. A., CORVO, M. L., VERMELHO, A. B., PAIVA, C. L. A., ALENCASTRO, R. B., COELHO, R. R. R. (eds.); Editora Interciência: Rio de Janeiro, Brasil; v. 1, pp. 369 - 380.
- GOKMEN, M. T., DU PREZ, F. E., 2012, “Porous polymer particles—A comprehensive guide to synthesis, characterization, functionalization and applications”, *Progress in Polymer Science*, v. 37, pp. 365 - 405.
- GONÇALVES, O. H., ASUA, J. M., ARAÚJO, P. H. H., MACHADO, R. A. F., 2008, “Synthesis of PS/PMMA Core-Shell Structured Particles by Seeded Suspension Polymerization”, *Macromolecules*, v. 41, pp. 6960 - 6964.
- GONÇALVES, O. H., MACHADO, R. A. F., ARAÚJO, P. H. H., ASUA, J. M., 2009, “Secondary particle formation in seeded suspension polymerization”, *Polymer*, v. 50, pp. 375 - 381.
- GOTOR, V., 2002, “Biocatalysis Applied to the Preparation of Pharmaceuticals”, *Organic Process Research & Development*, v. 6, pp. 420 - 426.

- GRAILLAT, C., PICHOT, C., GUYOT, A., EL AASSER, M. S., 1986, “Inverse Emulsion Polymerization of Acrylamide. I. Contribution To The Study of Some Mechanistic Aspects”, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 24, pp. 427 - 449.
- GU, Q., LIN, Q., HU, C., YANG, B., 2005, “Study on Emulsion and Suspension In Situ Polymerization”, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 95, pp. 404 - 412.
- HANEFELD, U., GARDOSI, L., MAGNER, E., 2009, “Understanding enzyme immobilisation”, *Chemical Society Reviews*, v. 38, pp. 453 - 468.
- HARKINS, W. D., 1945a, “A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 13, pp. 381 - 382.
- HARKINS, W. D., 1945b, “A General Theory of the Reaction Loci in Emulsion Polymerization II”, *The Journal of Chemical Physics*, v. 13, pp. 47 - 48.
- HARKINS, W. D., 1947, “A General Theory of the Mechanism of Emulsion Polymerization”, *Journal of American Chemical Society*, v. 69, pp. 1428 - 1444.
- HERNANDEZ, K., GARCIA-GALAN, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2011, “Simple and efficient immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 49, pp. 72 - 78.
- HEYDARPOOR, S., ABBASI, F., JALILI, K., NAJAFPOUR, M., 2015, “Synthesis of core-shell PS/PMMA expandable particles via seeded suspension polymerization”, *Journal of Polymer Research*, v. 22, pp. 1 - 10.
- HOMAEI, A. A., SARIRI, R., VIANELLO, F., STEVANATO, R., 2013, “Enzyme immobilization: an update”, *Journal of Chemical Biology*, v. 6, pp. 185 - 205.

- HORIE, K., BARÓN, M., FOX, R. B., HE, J., HESS, M., KAHOVEC, J., KITAYAMA, T., KUBISA, P., MARÉCHAL, E., MORMANN, W., STEPTO, R. F. T., TABAK, D., VOHLÍDAL, J., WILKS, E. S., WORK, W. J., 2007, “Definitions of Terms Relating to the Structure and Processing of Sols, Gels, Networks, and Inorganic-Organic Hybrid Materials (Iupac Recommendations 2007)”, *Pure and Applied Chemistry*, v. 79, pp. 1801 - 1829.
- IHA, R. K., WOOLEY, K. L., NYSTRÖM, A. M., BURKE, D. J., KADE, M. J., HAWKER, C. J., 2009, “Applications of Orthogonal, “Click” Chemistries in the Synthesis of Functional Soft Materials”, *Chemical Reviews*, v. 109, pp. 5620 - 5686.
- IJIMA, M., NAGASAKI, Y., OKADA, T., KATO, M., KATAOKA, K., 1999, “Core-Polymerized Reactive Micelles from Heterotelechelic Amphiphilic Block Copolymers”, *Macromolecules*, v. 32, pp. 1140 - 1146.
- JAEGER, K., EGGERT, T., 2002, “Lipases for biotechnology “, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 390 - 397.
- JAHANZAD, F., SAJJADIB, S., BROOKS, A. B. W., 2005, “Characteristic intervals in suspension polymerisation reactors: An experimental and modelling study”, *Chemical Engineering Science*, v. 60, pp. 5574 - 5589.
- JO, H., THEATO, P., 2015, “Post-polymerization Modification of Surface-Bound Polymers”, *Advances in Polymer Science*, pp. 1 - 30.
- JORALEMON, M. J., O'REILLY, R. K., HAWKER, C. J., WOOLEY, K. L., 2005, “Shell Click-Crosslinked (SCC) Nanoparticles: A New Methodology for Synthesis and Orthogonal Functionalization”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 127, pp. 16892 - 16899.
- JUNG, C., ALLEN, P. B., ELLINGTON, A. D., 2016, “A stochastic DNA walker that traverses a microparticle surface”, *Nature Nanotechnology*, v. 11, pp. 157 - 164.

- KAHRAMAN, M. V., BAYRAMOĞLU, G., KAYAMAN-APOHAN, N., KAYAMAN-APOHAN, N., GÜNGÖR, A., 2007, “ $\alpha$ -Amylase immobilization on functionalized glass beads by covalent attachment”, *Food Chemistry*, v. 104, pp. 1385 - 1392.
- KALFAS, G., YUAN, H., RAY, W. H., 1993, “Modeling and Experimental Studies of Aqueous Suspension Polymerization Processes. 2. Experiments in Batch Reactors”, *Industrial and Engineering Chemical Research*, v. 32, pp. 1831-1838.
- KIPARISSIDES, C., 1996, “Polymerization Reactor Modeling: A Review of Recent Developments and Future Directions”, *Chemical Engineering Science*, v. 51, pp. 1637 - 1659.
- KLIBANOV, A. M., 1979, “Enzyme stabilization by immobilization”, *Analytical Biochemistry*, v. 93, pp. 1 - 25.
- KOELLER, K. M., WONG, C., 2001, “Enzymes for chemical synthesis”, *Nature*, v. 409, pp. 232 - 240.
- KOLB, H. C., FINN, M. G., SHARPLESS, K. B., 2001, “Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions”, *Angewandte Chemie International Edition*, v. 40, pp. 2004 - 2021.
- KURZHALS, S., GAL, N., ZIRBS, R., REIMHULT, E., 2017, “Aggregation of thermoresponsive core-shell nanoparticles: Influence of particle concentration, dispersant molecular weight and grafting”, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 500, pp. 321 - 332.
- LAUS, M., DINNELLA, C., LANZARINI, G., CASAGRANDE, A., 1996, “Core-shell functional microspheres by dispersion polymerization: 2. Synthesis and characterization”, *Polymer*, v. 37, pp. 343 - 347.



- LEI, L., ZHANG, Q., SHI, S., ZHU, S., 2015, "Oxygen and carbon dioxide dual gas-responsive and switchable microgels prepared from emulsion copolymerization of fluoro- and amino-containing monomers", *Langmuir*, v. 31, pp. 2196 - 2201.
- LEMOS, J. L. S., BON, E. P. S., SANTANA, M. F. E., 2000, "Thermal stability of xylanases produced by *Aspergillus awamori*", *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 31, pp. 206 - 211.
- LENZI, M. K., 2002, *Modelagem da Polimerização Simultânea de Estireno em Suspensão e Emulsão*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- LENZI, M. K., LIMA, E. L., PINTO, J. C., 2006, "Detecting core-shell structure formation using near infrared spectroscopy", *Journal of Near Infrared Spectroscopy*, v. 14, pp. 1 - 9.
- LENZI, M. K., SILVA, F. M., LIMA, E. L., PINTO, J. C., 2003, "Semibatch Styrene Suspension Polymerization Processes", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 89, pp. 3021 - 3038.
- LI, S., YANG, X., YANG, S., ZHU, M., WANG, X., 2012, "Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering", *Computational and Structural Biotechnology Journal*, v.2, pp. 1 - 11.
- LI, W., STÖVER, H. D. H., 2000, "Monodisperse Cross-Linked Core-Shell Polymer Microspheres by Precipitation Polymerization", *Macromolecules*, v. 33, pp. 4354 - 4360.
- LIU, W., DUAN, H., MENG, X., QUIN, D., WANG, X., ZHANG, J., 2013, "Immobilization of *Candida lipolytica* Lipase on Macroporous Beaded Terpolymers with Epoxy Groups", *Journal of Applied Polymer Science*, pp. 4251 - 4255.

- LUTZ, S., 2004, “Engineering lipase B from *Candida antarctica*”, *Tetrahedron: Asymmetry*, v. 15, pp. 2743 - 2748.
- MACHADO, F., LIMA, E. L., PINTO, J. C., 2007, “Uma Revisão Sobre os Processos de Polimerização em Suspensão”, *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 17, pp. 166 - 179.
- MANOEL, E. A., 2011, *Resolução de derivados racêmicos do mio-inositol catalisada por lipases*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MANOEL, E. A., 2014, *Obtenção de Biocatalisador para Resolução Cinética de Derivados de Mio-Inositol*. Tese de D.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- MANOEL, E. A., ROBERT, J.M., PINTO, M. C. C., MACHADO, A. C. O., BESTETI, M. D., COELHO, M. A. Z., SIMAS, A. B. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PINTO, J. C., FREIRE, D. M. G., 2016a, “Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media”, *RSC Advances*, v. 6, pp. 4043 - 4052.
- MANOEL, E. A., PINTO, M. C. C., DOS SANTOS, J. C. S., TACIAS-PASCACIO, V., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2016b, “Design of a core-shell support to improve lipase features by immobilization”, *RSC Advances*, v. 6, pp. 62814 - 62824.
- MARKET RESEARCH AND CONSULTING / GRAND VIEW RESEARCH, 2016, “Enzymes Market By Type (Industrial, Specialty), By Product (Carbohydrases, Proteases, Lipases, Polymerases & Nucleases), By Application (Food & Beverages, Detergents, Animal Feed, Textile, Paper & Pulp, Nutraceutical, Personal Care & Cosmetics, Wastewater, Research & Biotechnology, Diagnostics, Biocatalyst) And Segment Forecasts To 2024”.

- MARKET RESEARCH AND CONSULTING / GRAND VIEW RESEARCH, 2016, “Enzymes Market Size Expected To Reach \$17.50 Billion By 2024”.
- MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNANDEZ-LORENTE, G., GUIBAN, J. M., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2007, “Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 40, pp. 1451 - 1463.
- McEWAN, K. A., SLAVIN, S., TUNNAH, E., HADDLETON, D. M., 2013, “Dual-functional materials via CCTP and selective orthogonal thiol-Michael addition/epoxide ring opening reactions”, *Polymer Chemistry*, v. 4, pp. 2608 - 2614.
- McKENZIE, A., HOSKINS, R., SWIFT, T., GRANT, C., RIMMER, S., 2017, “Core (Polystyrene)–Shell [Poly(glycerol monomethacrylate)] Particles”, *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 9, pp. 7577 - 7590.
- MEHRASBI, M. R., MOHAMMADI, J., PEYDA, M., MOHAMMADI, M., 2017, “Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase on core-shell magnetic nanoparticles for production of biodiesel from waste cooking oil”, *Renewable Energy*, v. 101, pp. 5931 - 602.
- MENDES, A. A., CASTRO, H. F., PEREIRA, E. B., FURIGO Jr., F., 2005, “Aplicação de Lipases no Tratamento de Águas Residuárias com Elevados Teores de Lipídeos”, *Química Nova*, v. 28, pp. 296 - 305.
- MENDIZABAL, E., CASTELLANOS-ORTEGA, J. R., PUIG, J. E., 1992, “A method for selecting a polyvinyl alcohol as stabiliser in suspension polymerization”, *Colloids and Surfaces*, v. 63, pp. 209 - 217.
- MILETIĆ, N., ABETZ, V., EBERT, K., LOSS, K., 2010, “Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on Polystyrene Nanoparticles”, *Macromolecular Rapid Communications*, v. 31, pp. 71 - 74.

- MILETIĆ, N., VUKOVIĆ, Z., NASTASOVIĆ, A., LOSS, K., 2009, “Macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene glycol dimethacrylate) resins — Versatile immobilization supports for biocatalysts”, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 56, pp. 196 - 201.
- MISRA, A., JARRETT, W. L., URBAN, M. W., 2009, “New Poly(methyl methacrylate)/n-Butyl Acrylate/Pentafluorostyrene/Poly(ethylene glycol) (p-MMA/nBA/PFS/PEG) Colloidal Dispersions: Synthesis, Film Formation, and Protein Adsorption”, *Macromolecules*, v. 42, pp. 7299 - 7308.
- MISSON, M., ZHANG, H., JIN, B., 2015, “Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications”, *Journal of The Royal Society Interface*, v. 12, pp. 1 - 20.
- MOJOVIC, L., KNEZEVIC, Z., POPADIC, R., JOVANOVIC, S., 1998, “Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on a polymer support”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 50, pp. 676 - 681.
- MOSES, J. E., MOORHOUSE, A. D., 2007, “The growing applications of click chemistry”, *Chemical Society Reviews*, v. 36, pp. 1249 - 1262.
- MUSSATTO, S. I., FERNANDES, M., MILAGRES, A. M. F., 2007, “Enzimas: Poderosa Ferramenta na Indústria”, *Ciência Hoje*, v. 41, pp. 28 - 33.
- NELSON, J. M., GRIFFIN, E. G., 1916, “Adsorption of invertase”, *Journal of the American Chemical Society*, v. 38, pp. 1109 - 1115.
- NORAKANKORN, C., PAN, Q., REMPEL, G. L., KIATKAMJONWONG, S., 2009, “Synthesis of Core/Shell Structure of Glycidyl-Functionalized Poly(methyl methacrylate) Latex Nanoparticles via Differential Microemulsion Polymerization”, *European Polymer Journal*, v. 45, pp. 2977 - 2986.

- ODIAN, G., 2004, *Principles of Polymerization*. 4<sup>a</sup> ed. New Jersey, USA, John Wiley & Sons.
- OKUBO, M., IZUMI, J., HOSOTANI, T., YAMASHITA, T., 1997, "Production of micron-sized monodispersed core/shell polymethyl methacrylate/polystyrene particles by seeded dispersion polymerization", *Colloid and Polymer Science*, v. 275, pp. 797 - 801.
- OKUBO, M., IZUMI, J., TAKEKOH, R., 1999, "Production of micron-sized monodispersed core/shell composite polymer particles by seeded dispersion polymerization", *Colloid and Polymer Science*, v. 277, pp. 875 - 880.
- OLIVEIRA, M., CIRILO, L. C. M., NELE, M., PINTO, J. C., 2015, "Synthesis of Spherical Core-Shell Poly(vinyl acetate)/Poly(vinyl alcohol) Particles for Use in Vascular Embolization: Study of Morphological and Molecular Modifications During Shell Formation", *Polymer Engineering and Science*, pp. 2237 - 2244.
- OTTEWILL, R. H., SCHOFIELD, A. B., WATERS, J. A., WILLIAMS, N. St. J., 1997, "Preparation of core-shell polymer colloid particles by encapsulation", *Colloid and Polymer Science*, v. 275, pp. 274 - 283.
- OZLEN, S. N., 1995, "Cosmetic Composition Containing Alpha Hydroxyacids, Salicylic Acid, and Enzyme Mixture of Bromelain and Papain", *US005441740A*.
- PALOMO, J. M., MUÑOZ, G., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., MATEO, C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., 2002, "Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 19 - 20, pp. 279 - 286.
- PATEL, R. N., 2001, "Enzymatic Synthesis of Chiral Intermediates for Drug Development", *Advanced Synthesis & Catalysis*, v. 343, pp. 527 - 546.

- PEIXOTO, L. S., CORDEIRO, F. B., MELO, P. A., NELE, M., PINTO, J. C., 2011, “Synthesis of Spherical Core-Shell PVAc-co-PMMA/PVA Particles for Use in Vascular Embolization”, *Macromolecular Symposia*, v. 299/300, pp. 132 - 138.
- PEIXOTO, L. S., MELO, P. A., NELE, M., PINTO, J. C., 2009, “Expanded Core/Shell Poly(vinyl acetate)/Poly(vinyl alcohol) Particles for Embolization”, *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 294, pp. 463 - 471.
- PEIXOTO, L. S., SILVA, F. M., NIEMEYER, M. A. L., ESPINOSA, G., MELO, P. A., NELE, M., PINTO, J. C., 2006, “Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol) and/or Poly(Vinyl Acetate) Particles with Spherical Morphology and Core-Shell Structure and its Use in Vascular Embolization”, *Macromolecular Symposia*, v. 243, pp. 190 - 199.
- PENG, S., SONG, L., WANG, Y., JI, L., XU, M., ZHANG, R., 2011, “The suspension-emulsion combined polymerization of fluorinated acrylic monomer and the fluorinated latex film surface properties”, *Colloid and Polymer Science*, v. 289, pp. 149 - 157.
- PINTO, J. C., ALVES, T. L. M., LIMA, E. L., SALIM, V. M. M., FIGUEIREDO, K. C. S., LENZI, M. K., 2004a, “Processo de Preparação de Resina Polimérica com Distribuição Bimodal de Pesos Moleculares e/ou com Estrutura Casca-Núcleo e seu Uso”, *Patente n° PI0400803-0*.
- PINTO, J. C., LOPEZ, G. E., NIEMEYER, M. A. L., SILVA, F. M., MELO, P. A., NELE, M., 2004b, “Processo de Síntese de Poli(Álcool Vinílico) e/ou Poli(Acetato de Vinila) com Morfologia Esférica e Estrutura Casca-Núcleo e seu Uso na Embolização Vascular”, *Patente n° PI0404994-2*.
- PINTO, J. C., LOPEZ, G. E., NIEMEYER, M. A. L., SILVA, F. M., MELO, P. A., NELE, M., 2006, “Process for the Synthesis of Poly(Vinyl Alcohol) and/or Poly(Vinyl Acetate) With Spherical Morphology and Shell and Nucleus Structure and Its Use in Vascular Embolization”, *Patente n° WO2006050591A2*.

- PINTO, M. C. C., 2013, *Influência de Variáveis Operacionais na Morfologia de Suportes Enzimáticos Preparados por Polimerização em Suspensão-Emulsão*. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- PINTO, M. C. C., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., 2014, "Influence of the Morphology of Core-Shell Supports on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*", *Molecules*, v. 19, pp. 12509 - 12530.
- PINTO, M. C. C., SANTOS Jr., J. G. F., PINTO, J. C., MACHADO, F., 2013b, "Suspension Polymerization Processes", *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, John Wiley & Sons, pp. 1 - 31.
- POPPE, J. K., COSTA, A. P. O., BRASIL, M. C., RODRIGUES, R. C., AYUBA, M. A., Z., 2013b, "Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, pp. 57 - 62.
- POPPE, J. K., GARCIA-GALAN, C., MATTEA, C. R., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C., AYUBA, M. A. Z., 2013a, "Optimization of synthesis of fatty acid methyl esters catalyzed by lipase B from *Candida antarctica* immobilized on hydrophobic supports", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 94, pp. 51 - 56.
- QIU, J., CHARLEUX, B., MATYJASZEWSKI, K., 2001, "Controlled/living radical polymerization in aqueous media: homogeneous and heterogeneous systems", *Progress in Polymer Science*, v. 26, pp. 2083 - 2134.
- RAO, J. P., GECKELER, K. E., 2011, "Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control Parameters", *Progress in Polymer Science*, v. 36, pp. 887 - 913.

- REDDY, C. K., RAJU, L. Y., SRINIVAS, P. V. S. S., RAO, P. S., SHEKHARAM, T., SHAILAJA, D., 2011, "Preparation and Characterization of Core-Shell Nanoparticles Containing Poly(chlorotrifluoroethylene-co-ethylvinylether) as Core", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 122, pp. 1807 - 1814.
- RESHMI, R., SANJAY, G., SUGUNAN, S., 2007, "Immobilization of  $\alpha$ -amylase on zirconia: A heterogeneous biocatalyst for starch hydrolysis", *Catalysis Communications*, v. 8, pp. 393 - 399.
- RIBEIRO, B. D., CASTRO, A. M., COELHO, M. A. Z., FREIRE, D. M. G., 2011, "Production and Use of Lipases in Bioenergy: A Review from the Feedstocks to Biodiesel Production", *Enzyme Research*, v. 2011, pp. 1 - 16.
- ROMÃO, B. M. V., DINIZ, M. F., AZEVEDO, M. F. P., LOURENÇO, V. L., PARDINI, L. C., DUTRA, R. C. L., 2003, "Caracterização por FT-IR de Agentes de Cura Utilizados em Resinas Epoxídicas-II-Polimercaptana, Poliaminoamida e Amina Modificada", *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, v. 13, pp. 173 - 180.
- ROY, S., FAVRESSE, P., LASCHEWSKY, A., CAL, J. C., ASUA, J. M., 1999, "Copolymerization Behavior of an Isobutenyl-Based Surfmer", *Macromolecules*, v. 32, pp. 5967 - 5969.
- SALIS, A., SANJUST, E., SOLINAS, V., MONDUZZI, M., 2003, "Characterization of Accurel MP1004 polypropylene powder and its use as a support for lipase immobilization", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 24 - 25, pp. 75 - 82.
- SANCHEZ-SANCHEZ, A., PÉREZ-BAENA, I., POMPOSO, J. A., 2013, "Advances in Click Chemistry for Single-Chain Nanoparticle Construction", *Molecules*, v. 18, pp. 3339 - 3355.



- SANTOS, J. G. F. Jr., 2007, Otimização do Processo de Obtenção do Cimento Ósseo à Base de PMMA. Dissertação de M.Sc., Universidade Federal do Rio de Janeiro, COPPE, Rio de Janeiro, RJ, Brasil.
- SARROUH, B., SANTOS, T. M., MIYOSHI, A., DIAS, R., AZEVEDO, V., 2012, “Up-To-Date Insight on Industrial Enzymes Applications and Global Market”, *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*, pp. 1 - 10.
- SAY, R., KEÇILI, R., BIÇEN, Ö., SISMAN, F. Y., HÜR, D., DENIZLI, A., ERSÖZ, A., 2011, “A novel nanoprotein particle synthesis: Nanolipase”, *Process Biochemistry*, v. 46, pp. 1688 - 1692.
- SCHWAAB, M., PINTO, J. C., 2007, Análise de Dados Experimentais I, 1ª ed. Rio de Janeiro, Brasil, e-papers.
- SÉVERAC, E, GALY, O., TURON, F., PANTEL, C. A., CONDORET, J. S., MONSAN, P, MARTY, A., 2011, “Selection of CalB immobilization method to be used in continuous oil transesterification: Analysis of the economical impact”, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 48, pp. 61 - 70.
- SHAW, D. J., 1992, *Introduction to Colloid and Surface Chemistry*. 4ª ed., Oxford, USA, Elsevier Science.
- SHELDON, R. A., VAN PELT, S., 2013, “Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how”, *Chemical Society Reviews*, v. 42, pp. 6223 - 6235.
- SONG, X., HU, J., WANG, C., 2011, “Synthesis of highly surface functionalized monodispersed poly(St/DVB/GMA) nanospheres with soap-free emulsion polymerization followed by facile “click chemistry” with functionalized alkylthiols”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 380, pp. 250 - 256.

- SOULA, O., GUYOT, A., WILLIAMS, N., GRADE, J., BLEASE, T., 1999, “Styrenic Surfmer in Emulsion Copolymerization of Acrylic Monomers. II. Copolymerization and Film Properties”, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, v. 37, pp. 4205 - 4217.
- STUTMAN, D. R., KLEIN, A., EL-AASSER, M. S., VANDERHOFF, J. W., 1985, “Mechanism of Core/Shell Emulsion Polymerization”, *Industrial and Engineering Chemistry Product Research and Development*, v. 24, pp. 404 - 412.
- TACIAS-PASCACIO, V. G., PEIRCE, S., TORRESTIANA-SANCHEZ, B., YATES, M., ROSALES-QUINTERO, A., VIRGEN-ORTÍZ, J. J., LAFUENTE, R. F., 2016, “Evaluation of Different Commercial Hydrophobic Supports for the Immobilization of Lipases: Tuning their Stability, Activity and Specificity”, *RSC Advances*, v. 102, pp. 100281 - 100294.
- TACIAS-PASCACIO, V. G., VIRGEN-ORTÍZ, J. J., JIMÉNEZ-PÉREZ, M., YATES, M., TORRESTIANA-SANCHEZ, B., ROSALES-QUINTERO, A., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2017, “Evaluation of different lipase biocatalysts in the production of biodiesel from used cooking oil: Critical role of the immobilization support”, *Fuel*, v. 200, pp. 1 - 10.
- TAI, Y., WANG, L., GAO, J., TAO, W., HUO, J., YANG, L., 2012, “Synthesis of Core/Shell Magnetic Porous Microspheres for Lipase Immobilization”, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, v. 22, pp. 213 - 222.
- TANG, E., YAO, M., DU, P., YUAN, M., LIU, S., 2016, “Synthesis and dynamic mechanical study of core-shell structure epoxy/polyacrylate composite particle”, *Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials*, v. 204, pp. 1 - 6.
- TEIXEIRA, V. G., COUTINHO, F. M. B., GOMES, A. S., 2001, “Principais Métodos de Caracterização da Porosidade de Resinas à Base de Divinilbenzeno”, *Química Nova*, v. 24, pp. 808 - 818.

- THURMOND, K. B., KOWALEWSKI, T., WOOLEY, K. L., 1997, "Shell Cross-Linked Knedels: A Synthetic Study of the Factors Affecting the Dimensions and Properties of Amphiphilic Core-Shell Nanospheres", *Journal of the American Chemical Society*, v. 119, pp. 6656 - 6665.
- TISCHER, W., KASCHE, V., 1999, "Immobilized enzymes: crystals or carriers?", *Trends in Biotechnology*, v. 17, pp. 326 - 335.
- TORRES, P., REYES-DUARTE, D., LÓPEZ-CORTÉS, N., FERRER, M., BALLESTEROS, A., PLOU, F. J., 2008, "Acetylation of vitamin E by *Candida antarctica* lipase B immobilized on different carriers", *Process Biochemistry*, v. 43, pp. 145 - 153.
- TORRES, R., ORTIZ, C., PESSELA, B. C. C., PALOMO, J. M., MATEO, C., GUISÁN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., 2006, "Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions", *Enzyme and Microbial Technology*, v. 39, pp. 167 - 171.
- UGELSTAD, J., HANSEN, F. K., 1976, "Kinetics and Mechanism of Emulsion Polymerization", *Rubber Chemistry and Technology*, v. 49, pp. 536 - 609.
- UPPENBERG, J., HANSEN, M. T., PATKAR, S., JONES, T. A., 1994, "The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*", *Structure*, v. 2, pp. 293 - 308.
- UPPENBERG, J., OEHRNER, N., NORIN, M., HULT, K., KLEYWEGT, G. J., PATKAR, S., WAAGEN, V., ANTHONSEN, T., JONES, T. A., 1995, "Crystallographic and Molecular Modeling Studies of Lipase B from *Candida antarctica* Reveal a Stereospecificity Pocket for Secondary Alcohols", *Biochemistry*, v. 34, pp. 16838 - 16851.

- VAN BEILEN, J. B., LI, Z., 2002, "Enzyme technology: an overview", *Current Opinion in Biotechnology*, v. 13, pp. 338 - 344.
- VIVALDO-LIMA, E., WOOD, P. E., HAMIELEC, A. E., 1997, "An Updated Review on Suspension Polymerization", *Industrial and Engineering Chemistry Research*, v. 36, pp. 939 - 965.
- WANG, Q., FU, S., YU, T., 1994, "Emulsion Polymerization", *Progress in Polymer Science*, v. 19, pp. 703 - 753.
- WANG, Z., WANG, Z., 2015, "Synthesis of cross-linkable fluorinated core-shell latex nanoparticles and the hydrophobic stability of films", *Polymer*, v. 74, pp. 216 - 223.
- WEISER, D., BENCZE, L. C., BÁNÓCZI, G., ENDER, F., KISS, R., KÓKAI, E., SZILÁGYI, A., VÉRTESSY, B. G., FARKAS, Ö., PAIZS, C., POPPE, L., 2015, "Phenylalanine Ammonia-Lyase-Catalyzed Deamination of an Acyclic Amino Acid: Enzyme Mechanistic Studies Aided by a Novel Microreactor Filled with Magnetic", *ChemBioChem*, v. 16, pp. 2283 - 2288.
- WINNIK, M. A., ZHAO, C., 1993, "Electron Microscopy Studies of Polystyrene-Poly (methylmet hacrylate) Core-Shell Latex Particles", *Langmuir*, v. 9, pp. 2053-2066.
- WU, W., HE, Q., JIANG, C., 2008, "Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies", *Nanoscale Research Letters*, v. 3, pp. 397 - 415.
- XU, F., DING, H., 2007, "A new kinetic model for heterogeneous (or spatially confined) enzymatic catalysis: Contributions from the fractal and jamming (overcrowding) effects", *Applied Catalysis A: General*, v. 317, pp. 70 - 81.

- YUAN, H. G., KALFAS, G., RAY, W. H., 1991, "Suspension Polymerization", *Journal of Macromolecular Science*, v. 31, pp. 215 - 299.
- YUAN, Y., LEE, T. R., 2013, "Contact Angle and Wetting Properties". In: BRACCO, G., HOLST, B. (eds), *Surface Science Techniques*, capítulo 1, Berlim, Alemanha, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- ZENG, Z., YU, J., GUO, Z., 2004, "Preparation of Carboxyl-Functionalized Polystyrene/Silica Composite Nanoparticles", *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 205, pp. 2197 - 2204.
- ZHANG, K., CHEN, H., CHEN, X., CHEN, Z., CUI, Z., YANG, B., 2003, "Monodisperse Silica-Polymer Core-Shell Microspheres via Surface Grafting and Emulsion Polymerization", *Macromolecular Materials and Engineering*, v. 288, pp. 380 - 385.
- ZHANG, Y., LI, H., DONG, J., HU, Y., 2014, "Facile synthesis of chain end functionalized polyethylenes via epoxide ring-opening and thiol-ene addition click chemistry", *Polymer Chemistry*, v. 5, pp. 105 - 115.
- ZHENQIAN, Z., YONGZHONG, B., ZHIMING, H., ZHIXUE, W., 2008, "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.

## *Apêndice A*

A análise das conversões dos comonômeros ao longo do tempo em cada uma das reações foi realizada a partir das Equações A.1 a A.5. Para isso, inicialmente, por meio da Equação A.1, foi possível calcular a massa de monômero alimentada entre os intervalos de amostragem.

$$\Delta m_{MonAlim} = [(C_1 * \rho_1) + (C_2 * \rho_2)] * [\bar{V} * (t_{amN+1} - t_{amN})]$$

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

sendo:  $\Delta m_{MonAlim}$ , a massa de monômero total alimentada na etapa de emulsão alimentada entre os tempos de amostragem;  $t_{amN}$ , o tempo de amostragem;  $t_{amN+1}$ , o tempo de amostragem no instante seguinte a  $t_{amN}$ ;  $\bar{V}$ , a vazão média entre os dois tempos de amostragem;  $\rho_1$  é a densidade do estireno na temperatura de 25 °C, 0,903 g.mL<sup>-1</sup>;  $\rho_2$  é a densidade do divinilbenzeno na temperatura de 25 °C, 0,914 g.ml<sup>L1</sup> (SIGMA-ALDRICH, 2013);  $C_1$  é a concentração mássica de estireno presente mistura monomérica;  $C_2$  é a concentração mássica de divinilbenzeno presente mistura monomérica.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

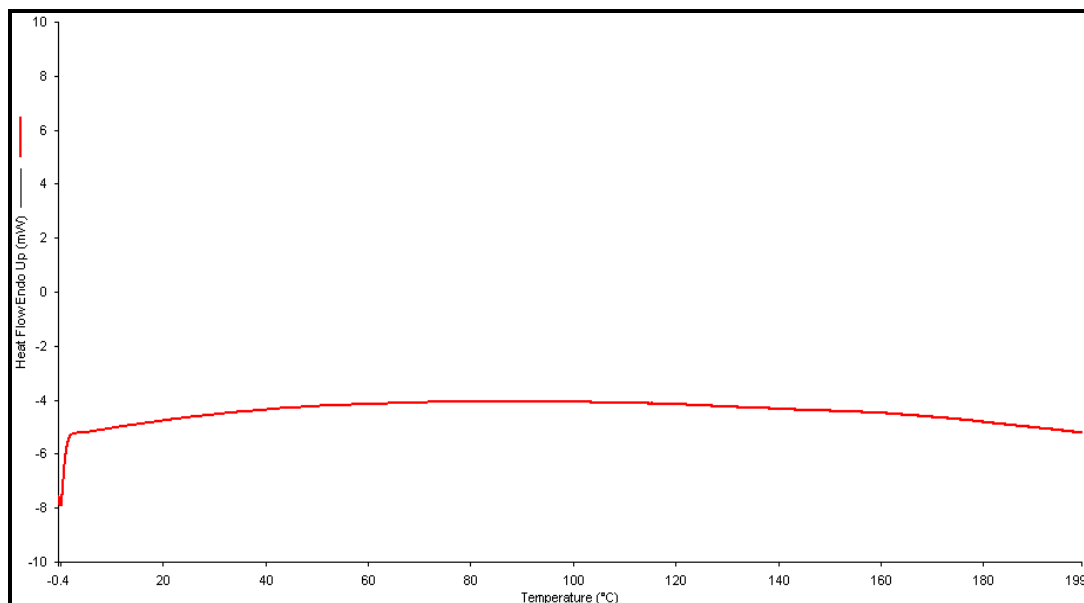
$$C_{N+1} = \frac{m_{seca} - m_{hid} - (m_{úmida} * \%AS) - (m_{úmida} * \%Bicarb) - (m_{úmida} * \%I_{Emuls}) - (m_{úmida} * \%I_{Susp}) - (m_{úmida} * \%Emulsif)}{(1 - \%I_{Susp} - \%Bicarb - \%AS - \%Água - \%I_{Emuls} - \%Emulsif)} * m_{úmida}$$

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

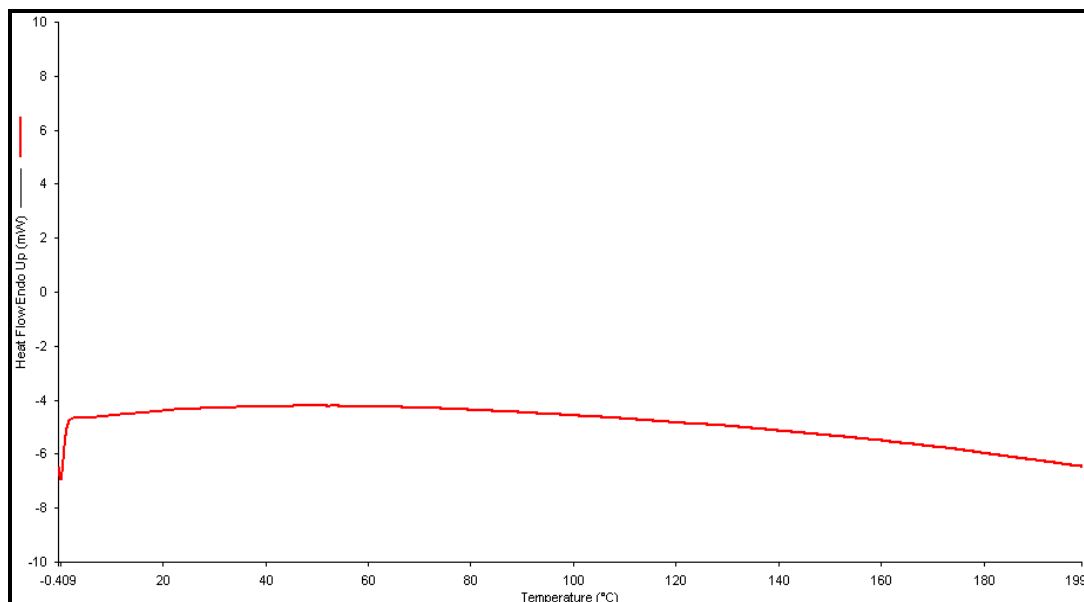
sendo:  $m_{seca}$ , a massa seca depois de estabilizada;  $m_{hid}$ , a massa de hidroquinona presente na solução aquosa de hidroquinona 1 % (p/p);  $m_{úmida}$ , a massa da amostra logo depois de retirá-la do reator;  $C_{N+1}$ , a conversão em cada instante N+1.

## Apêndice B

São apresentados a seguir os termogramas de DSC das partículas produzidas na *Seção 2.3.1* do presente trabalho.

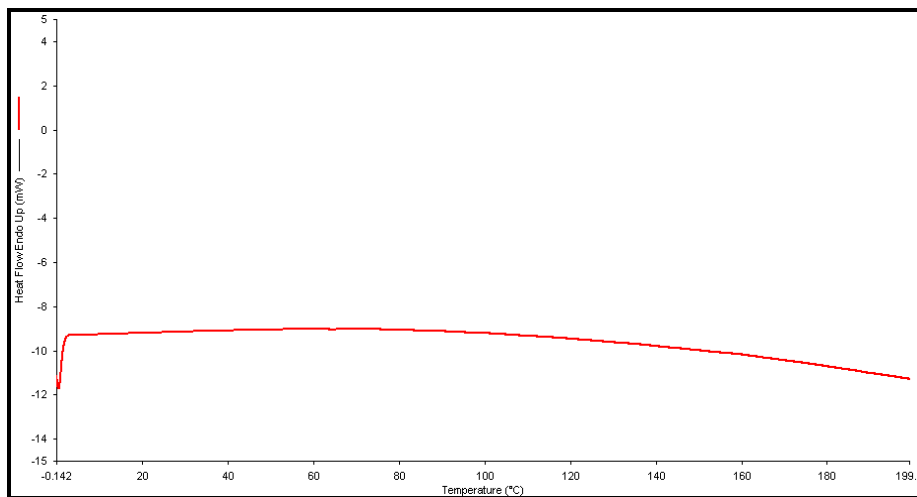


**Figura B.1.** Curva de DSC do produto da Reação 1.

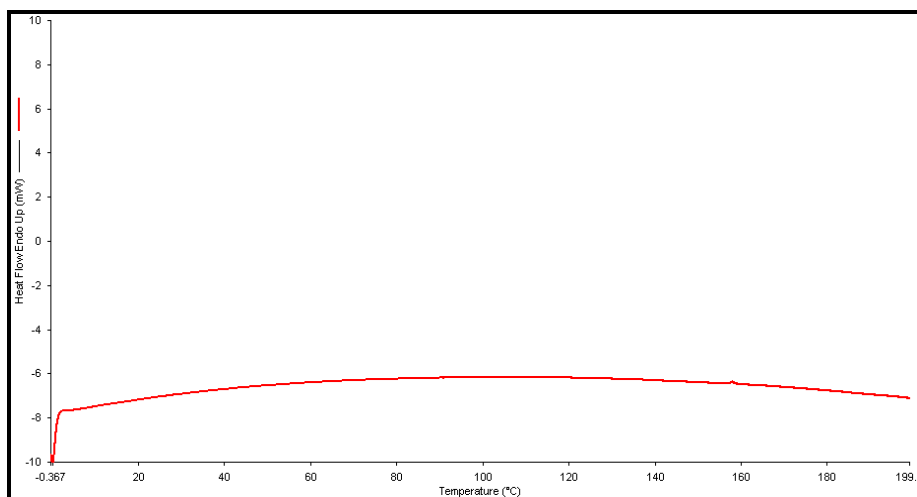


**Figura B.2.** Curva de DSC do produto da Reação 2.

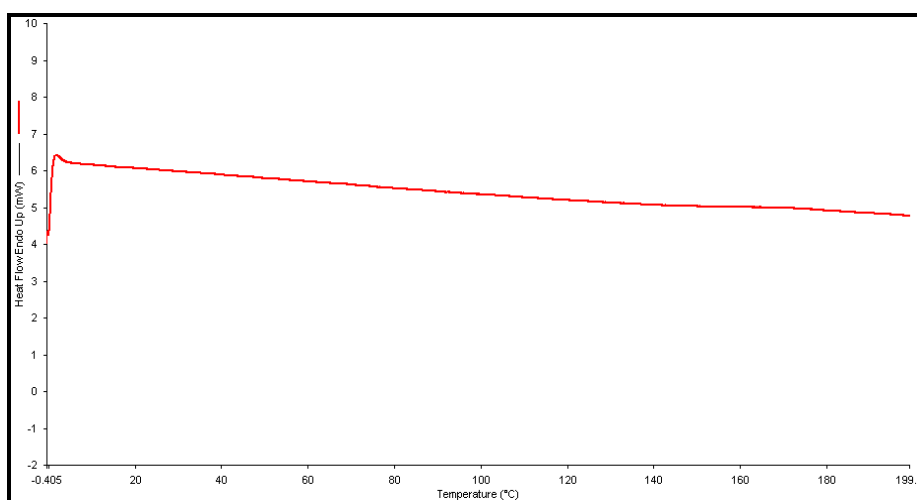




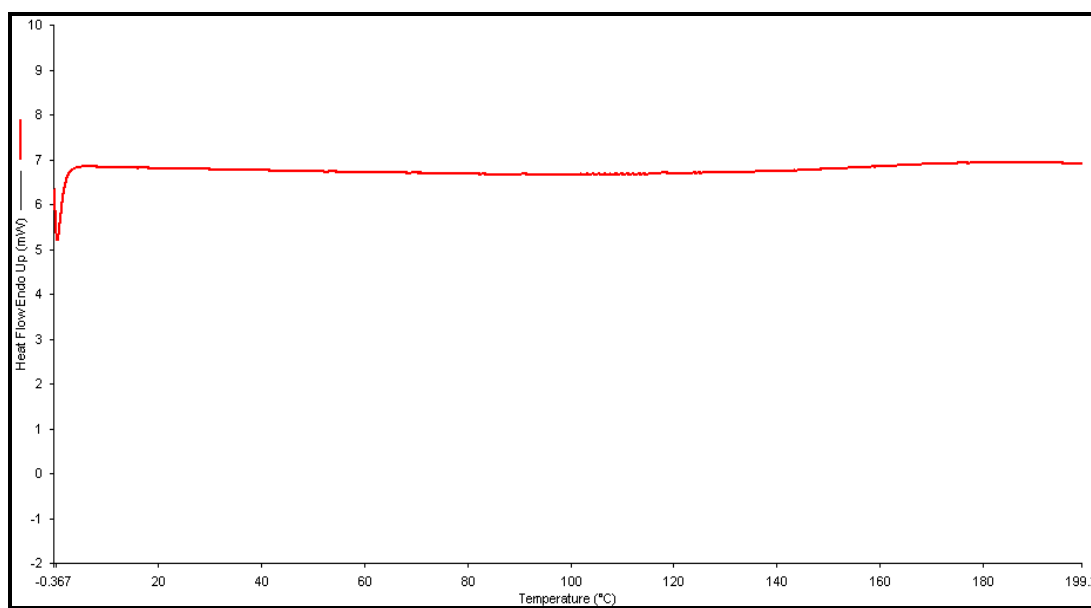
**Figura B.3.** Curva de DSC do produto da Reação 3.



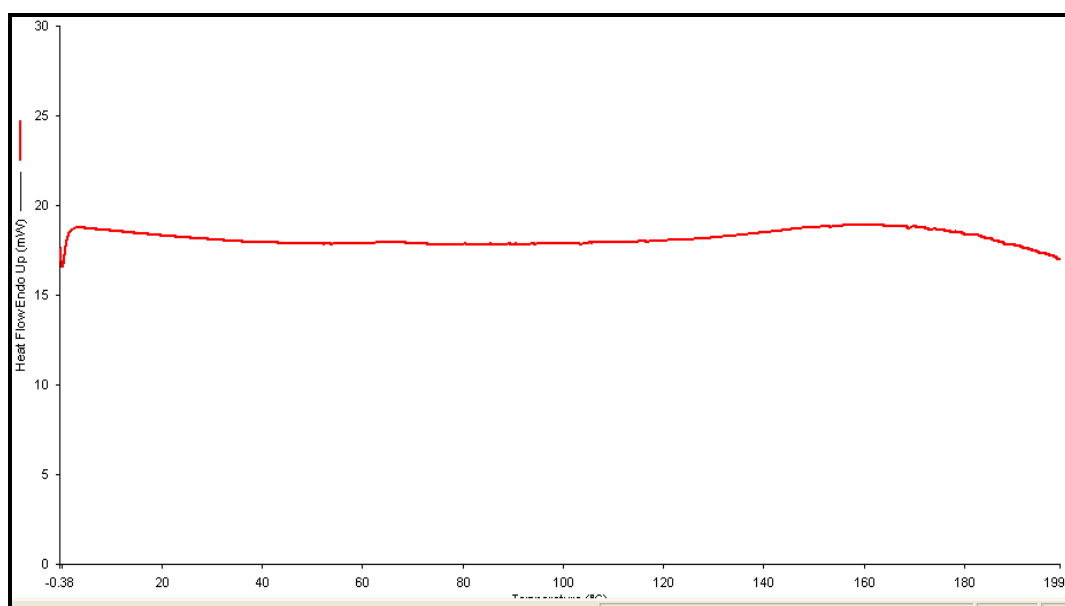
**Figura B.4.** Curva de DSC do produto da Reação 4.



**Figura B.5.** Curva de DSC do produto da Reação 5.



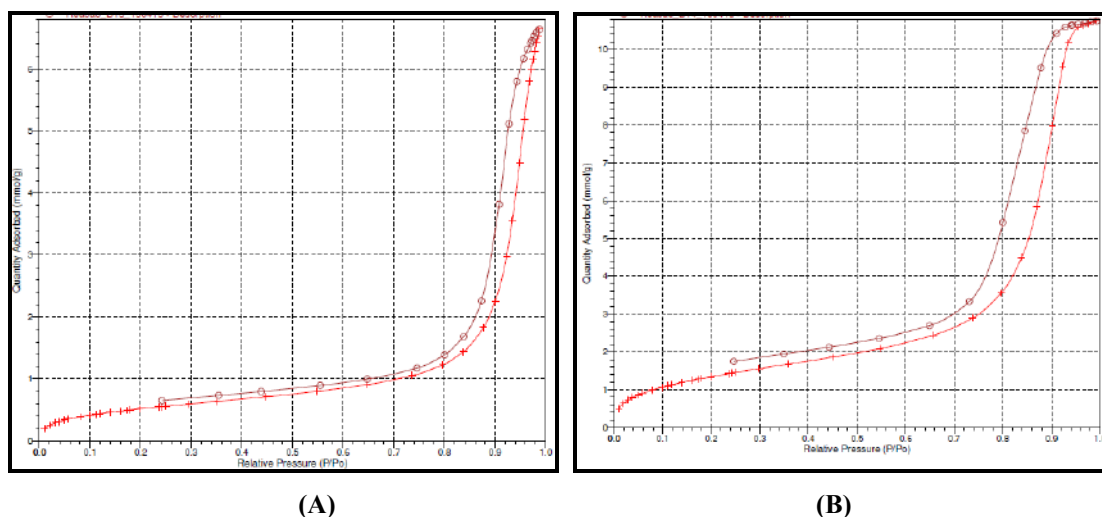
**Figura B.6.** Curva de DSC do produto da Reação 6.



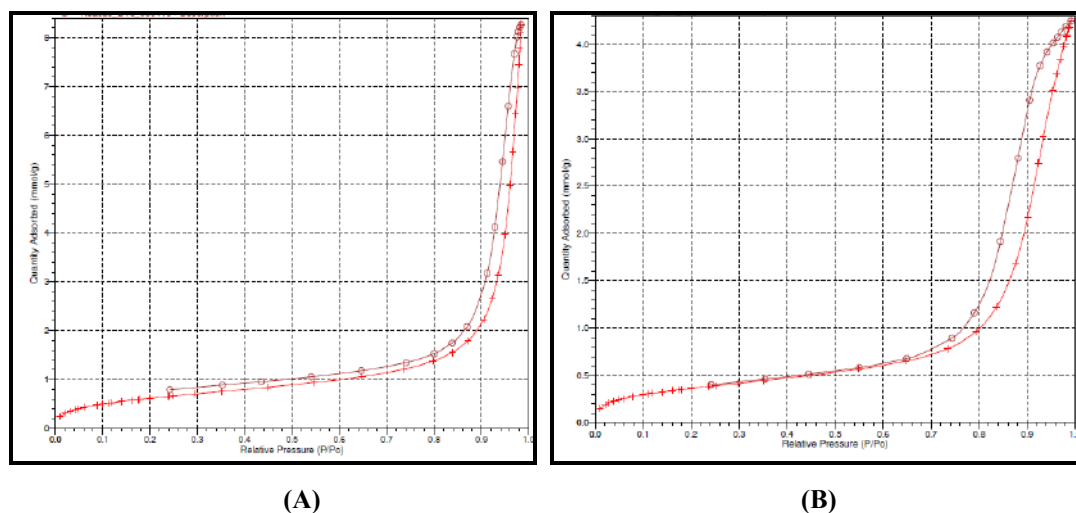
**Figura B.7.** Curva de DSC do produto da Reação 7.

## Apêndice C

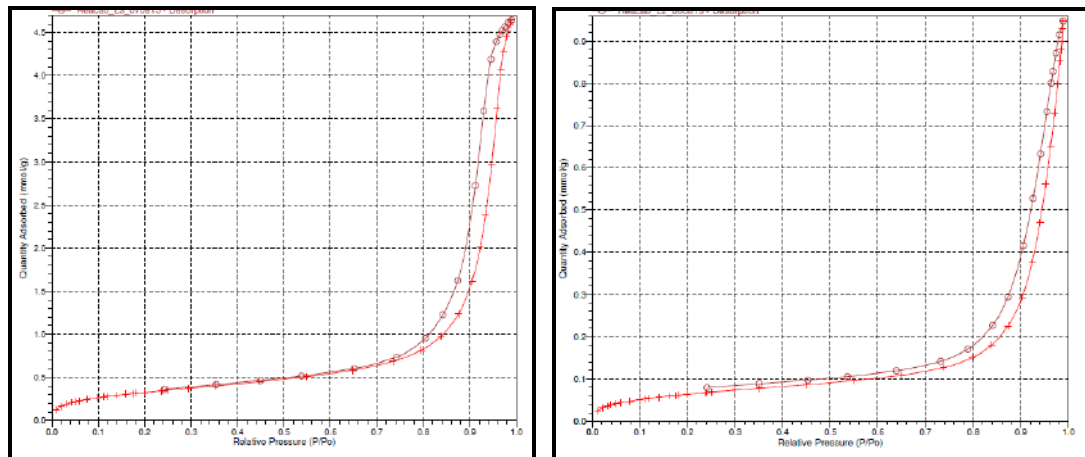
São apresentados a seguir as isotermas de fisissorção de nitrogênio dos suportes produzidos e empregados no processo de imobilização enzimática.



**Figura C.1.** Isotermas: (A) Reação 13 (Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)); (B) Reação 14 (Nanopartículas; P(S-co-DVB)).



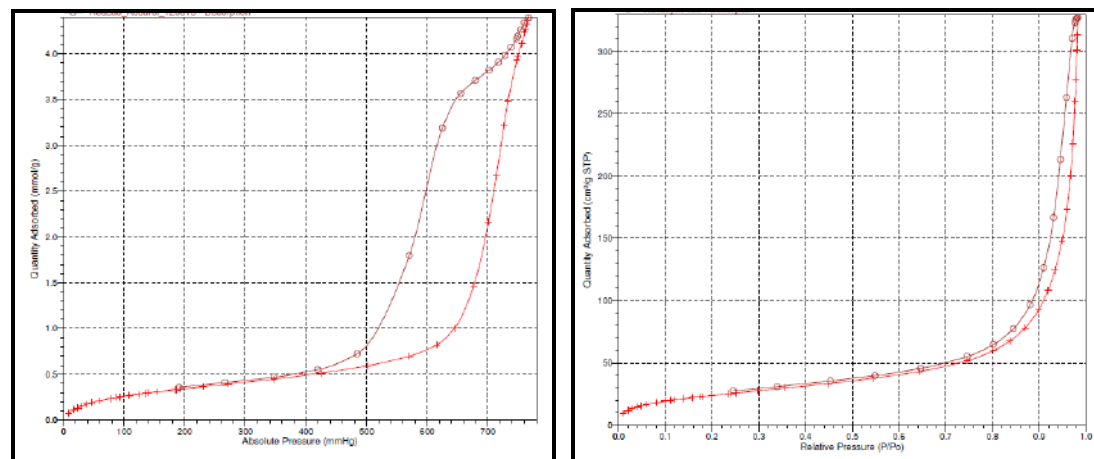
**Figura C.2.** Isotermas: (A) Reação 16 (Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)); (B) Piloto\_1 (Casca-núcleo; PMMA/PMMA).



(A)

(B)

**Figura C.3.** Isothermas: (A) Pilot\_4 (Casca-núcleo; P(MMA-co-DVB)/P(MMA-co-DVB)); (B) Pilot\_5 (Casca-núcleo; P(S-co-DVB)/P(S-co-DVB)).



(A)

(B)

**Figura C.4.** Isothermas: (A) Accurel; (B) Novozym 435.

---

---

## Apêndice D

Artigos publicados ao longo do período do doutorado relacionados ao tema da presente tese.

- 1 - PINTO, M. C. C., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., 2014, “Influence of the Morphology of Core-Shell Supports on the Immobilization of Lipase B from *Candida antarctica*”, *Molecules*, v. 19, pp. 12509 – 12530.
  
- 2 - MANOEL, E. A., PINTO, M. C. C., Dos SANTOS, J. C. S., TACIAS-PASCACIO, V. G., FREIRE, D. M. G., PINTO, J. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., 2016, “Evaluation of the performance of differently immobilized recombinant lipase B from *Candida antarctica* preparations for the synthesis of pharmacological derivatives in organic media”, *RSC Advances*, v. 6, pp. 4043 – 4052.
  
- 3 - MANOEL, E. A., ROBERT, J. M., PINTO, M. C. C., MACHADO, A. C. O., BESTETI, M. D., COELHO, M. A. Z., SIMAS, A. B. C., FERNANDEZ-LAFUENTE, R., PINTO, J. C., FREIRE, D. M. G., 2016, “Design of a core-shell support to improve lipase features by immobilization”, *RSC Advances*, v. 6, pp. 62814 – 62824.
  
- 4 - PINTO, M. C. C., SANTOS Jr., J. G. F., PINTO, J. C., MACHADO, F., 2013, “Suspension Polymerization Processes”, *Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, *John Wiley & Sons*, pp. 1 – 31.
  
- 5 - PINTO, M. C. C., GOMES, F. W., LEIZA, J. R., PINTO, J. C., 2016, “Control of Polymerization Processes”, *Major Reference Works*, *Elsevier*, pp. 1 – 23.