

**BIOCATALISADORES MAGNÉTICOS A PARTIR DE  
QUITOSANA**

**DARLAN SILVEIRA MARUM**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY  
RIBEIRO - UENF**

**CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
NOVEMBRO - 2013**

# **BIOCATALISADORES MAGNÉTICOS A PARTIR DE QUITOSANA**

**DARLAN SILVEIRA MARUM**

"Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais".

Orientador: Prof, Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
NOVEMBRO – 2013

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

07/2014

Marum, Darlan Silveira

Biocatalisadores magnéticos a partir de quitosana / Darlan Silveira

Marum. – Campos dos Goytacazes, 2013.

xvi, 107 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) --  
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de  
Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos  
dos Goytacazes, 2013.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodríguez.

Área de concentração: Polímeros e compósitos.

Bibliografia: f. 100-107.

1. QUITOSANA 2. EPICLORIDRINA 3. MICROESFERAS 4.  
BIOCATALISADORES I. Universidade Estadual do Norte Fluminense  
Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório Materiais  
Avançados II. Título

CDD 620.192

# BIOCATALISADORES MAGNÉTICOS A PARTIR DE QUITOSANA

**DARLAN SILVEIRA MARUM**

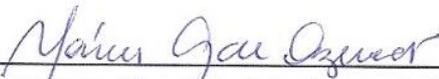
"Defesa de dissertação apresentado ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção de título de Mestre em Engenharia e Ciência dos Materiais".

Comissão Examinadora:



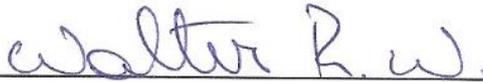
---

D.Sc. Elaine Aparecida Santos Carvalho (Engenharia e Ciência dos Materiais)  
– UENF/ LAMAV



---

D. Sc. Márcia Giardinieri de Azevedo (Engenharia Química) – UENF/ LAMAV



---

D. Sc. Walter Ruggeri Waldman (Química) - UFSCAR



---

PhD. Rubén Sánchez Rodríguez (Ciências Químicas) – UENF/CCT- LAMAV  
(Orientador)

**Dedico este trabalho aos meus pais  
Deuzedir e Leida, cujo amor, carinho e  
atenção foram decisivos para essa  
importante conquista de agora**

Depois de algum tempo você, aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar com os outros, mas com o melhor que pode ser. Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto.

(William Shakespeare)

## AGRADECIMENTOS

A Deus que sempre iluminou meus caminhos e esteve presente em minha vida dando sabedoria, perseverança e força, para a conclusão desta etapa importante em minha caminhada.

Aos meus pais Deuzedir Torres Marum e Maria Leida Silveira Marum, pela paciência, apoio nos momentos difíceis, amor e carinho sempre concedidos

A minha irmã Deuziane Silveira Marum e ao meu cunhado Levi Oliveira, pelo carinho, compreensão, amizade companheirismo e apoio.

Ao professor Rubén Sanchez pela dedicada orientação, amizade, sabedoria e agradável convivência e principalmente por acreditar em mim aceitando ser meu orientador sem mesmo me conhecer.

A professora Maria Inês Bruno Tavares, por realizar a análise de RMN, pela contribuição financeira na compra de reagente, pela amizade e pelo apoio.

As minhas eternas professoras Camila Rodrigues Amaral e Erica Marques da Silva Santos, por me mostrar o caminho para construir uma vida acadêmica, o que sou hoje essas duas tem uma pequena participação, pela amizade, pelo carinho e apoio.

Ao professor Claudio (*in memoria*) do CBB, por sempre me receber no seu laboratório com um sorriso e de braços abertos, pronto pra ajudar no que eu precisasse.

Ao coordenador do Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, pela confiança e credibilidade.

As minhas duas ajudantes Helen BoaMorte e Mayara Castro, pela ajuda da realização deste trabalho, pela paciência, pela dedicação de horas no laboratório, pelos finais de semana que passamos realizando os experimentos, pela amizade e apoio.

À Marta Duarte pelas análises de ângulo de contato, na COPPE- UFRJ

À Tereza Eliggio, pela amizade, apoio e pelas análises de Termogravimetria

À Zulmira Guimarães pela análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Ao Djalma pelas análises de AFM e apoio na solução de problemas com os resultados de permeabilidade.

Ao meu amigo Lucivan, pelas incansáveis vezes em que pedia para instalar o Oringin no meu computador, pela amizade e apoio.

Ao meu amigo Magno Bessa, por sempre me ouvir quando eu estava pra baixo

As minhas amigas Myrian e Katia, pela amizade, pelas caronas de volta pra casa, pela alegria e por sempre estarem ao meu lado me dando aquela palavra de força.

A minha amiga Martinha, pelos abraços quando eu chegava ao laboratório.

As minhas amigas Michele Leal e Milena Diniz, pela amizade, carinho e por ter aberto a porta da sua casa para me acolher.

Aos meus amigos que fiz ao longo dessa caminhada Mariane, Simone, Melina, Leticia, Elaine, Mario Lucas, Shirlene, Vanilda, Márcia, Barbara, Emilene, Quésia, Cristiane, Juvenil, Michel e Renan.

A minha eterna amiga Paula de Paula, pela amizade, pelo carinho, pelos momentos felizes, pelos conselhos e por me acolher sempre na sua casa na hora do almoço

Em especial à uma grande amiga, Elaine Carvalho pela amizade, companheirismo, pelos puxões de orelhas, pelo seu conhecimento, estando sempre pronta a me ajudar, sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

Aos professores do Laboratório de Materiais Avançados.

À todos os funcionários do Laboratório de Materiais Avançados.

À empresa Granotec, pela doação da enzima FLIP/BR

À CAPES pelo apoio financeiro, para a realização deste trabalho.

À UENF pela estrutura Física e oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	vi
ÍNDICE DE TABELAS .....	xi
ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIações .....	xii
RESUMO .....	xiv
ABSTRACT .....	xvi
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 – OBJETIVOS .....	3
1.1.1 – OBJETIVOS GERAIS .....	3
1.1.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
1.2 – JUSTIFICATIVAS .....	4
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
2.1 – BIODIESEL .....	6
2.1.1 – PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO ..	7
2.2 – BIOCATALISADORES .....	10
2.2.1 – CATÁLISE ENZIMÁTICA .....	12
2.2.1.1 – ATUAÇÃO DAS ENZIMAS .....	16
2.3 – LIPASE .....	18
2.3.1 – MECANISMO DAS LIPASES .....	22
2.4 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	23
2.4.1 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO .....	25
2.4.1.1 – LIGAÇÃO COVALENTE .....	27

2.4.1.2 – LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA .....	28
2.4.1.3 – MICROEMCAPSULAMENTO .....	28
2.3.1.4 – ADSORÇÃO .....	29
2.5 – QUITOSANA .....	30
2.5.1 – OBTENÇÃO DA QUITOSANA .....	30
2.5.2 – ESTRUTURA E ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITOSANA .....	31
2.5.3 – MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA ESTRUTURA DA QUITOSANA.....	34
2.5.4 – MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA DA QUITOSANA.....	35
2.5.4.1 – MODIFICAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO .....	37
2.5.4.2 – MODIFICAÇÃO COM EPICLORIDRINA .....	43
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
3.1 – MATERIAIS .....	48
3.2 – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA .....	49
3.3 – SÍNTESE DA MAGNETITA (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) .....	49
3.3.1 – CARACTERIZAÇÃO DAS MAGNETITAS .....	50
3.4 – FORMULAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM NÚCLEO MAGNÉTICO .....	51
3.5 – MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM NÚCLEO MAGNÉTICO .....	53
3.6 – ATIVAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS COM GLUTARALDEÍDO .....	54

3.7 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE PARTIDA E MODIFICADA .....	54
3.7.1 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	54
3.7.2 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	55
3.7.3 – DETERMINAÇÃO DA CARGA MAGNETICA E ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO DAS MICROESFERAS.....	57
3.7.3.1 – TERMOGRAVIMÉTRIA (TGA) .....	57
3.7.3.2 – CALORIMÉTRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC) .....	57
3.7.4 – MICROSCÓPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) .....	58
3.7.5 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO .....	58
3.7.6 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS .....	58
3.8 – PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA .....	59
3.8.1 – MODIFICAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA .....	59
3.8.2 – CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL COM AUXILIO DA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA) .....	60
3.8.3 - ANALISE DO IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QTS COM EPICLORIDRINA SOBRE O COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE A VAPORES DE ÁGUA .....	61
3.8.4 – ÂNGULO DE CONTATO .....	63
3.9 – IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR LIGAÇÃO COVALENTE .....	65
3.10 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLITICA .....	65

## CAPITULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 – CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA NÃO MODIFICADA (QTS) E MODIFICADA (QTS/EPC) .....	67
4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QTS E QTS/EPC .....	66
4.1.2 - ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO DOS FILMES DE QTS E QTS/EPC .....	68
4.1.3 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DOS FILMES DE QTS E QTS/EPC POR AFM .....	70
4.1.4 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QTS COM EPICLORIDRINA SOBRE O COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE A VAPORES DE ÁGUA .....	73
4.1.5 – HIDROFILICIDADE DA QTS E QTS/EPC .....	76
4.2 – FORMULAÇÃO DE MICROESFERAS DE QUITOSANA MODIFICADA COM EPC CONTENDO NÚCLEO MAGNÉTIC .....	78
4.3 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS .....	80
4.4 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DAS MICROESFERAS DE QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> E QTS-EPC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ....	82
4.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS COM PROPRIEDADES MAGNETICAS .....	85
4.5.1 – ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO COM TRASFORMADA DE FOURIE (FTIR) .....	85
4.6 – DETERMINAÇÃO DA CARGA MAGNETICA E ESTUDO DO COMPORTAMENTO TERMICO DAS MICROESFERAS .....	87
4.6.1 – TÉCNICA TERMOGRAVIMETRICA(TGA) .....	87
4.6.2 – CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATORIA (DSC) .....	88
4.7 – RESSONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN) <sup>1</sup> H .....	90

4.8 – PROPRIEDADE MAGNÉTICA DA CARGA DE MAGNETITA NO SUPORTE POLIMÉRICO .....	92
4.10 – ATIVIDADE CATALÍTICA .....	94
4.9.1 – IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE E ATIVIDADE HIDROLÍTICA .....	94
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES .....	97
CAPÍTULO 6 – RECOMENDAÇÕES .....	99
6.1 – RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS .....	99
CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	100

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (ANP, 2012) .....	6
<b>Figura 2</b> -Esquema resumido da produção de biodiesel (Martins, 2008) .....	8
<b>Figura 3</b> – Processo de produção de biodiesel por transesterificação; <b>(A)</b> usando catálise alcalina; <b>(B)</b> usando catálise enzimática (Rodrigues, 2009) .....	9
<b>Figura 4</b> – Representação da atividade de um catalisador numa reação química.....	11
<b>Figura 5</b> – Mecanismo de atuação das enzimas (SoBiologia, 2013) .....	11
<b>Figura 6</b> – Estruturas básicas de biocatalisadores em noescala. (a) com Nanopartículas de superfícies ligados enzimas. (b) realização Nanofibras enzimas. (c) Matriz nanoporoso com enzimas aprisionadas. (d) nanotubos de carbono enzimas materiais híbridos (Wang, 2006) .....	12
<b>Figura 7</b> – Representações gráficas das estruturas tridimensionais secundárias (A e B) eterciarias (C e D) obtidas por Raio – X da lipase de <i>Penicilliu</i> (Moreira, 2003) .....	13
<b>Figura 8</b> – Esquema da reação de hidrólise da uréia (Almeida et. al.) .....	14
<b>Figura 9</b> – Modelo da ligação específica de um substrato pró-quiral ao sitio ativo da enzima (Moreira, 2003) .....	17
<b>Figura 10</b> – Utilização relativa das enzimas em biotransformações (Moreira, 2003) .....	18
<b>Figura11</b> – Representação esquemática das reações catalisadas por lipase (Castro et.al.) .....	19
<b>Figura 12</b> – Conformações estruturais da lipase <i>Candida rugosa</i> . (a) Conformação fechada; (b) Conformação aberta (Rodrigues, 2009) .....	22
<b>Figura 13</b> – Métodos de imobilização de enzimas (Moreira, 2003) .....	25
<b>Figura 14</b> - Fatores primordiais a serem considerados em imobilização de enzimas (Grigolon, 2001) .....	26
<b>Figura 15</b> – Imobilização de enzimas sobre suporte (Santos, 2009) .....	27

<b>Figura 16</b> – Imobilização de um biocatalisador via microencapsulamento (Santos, 2009) .....	29
<b>Figura 17</b> – Esquema resumido dos dois processos de adsorção (Rebelo, 2009) .....	30
<b>Figura 18</b> – Estrutura da celulose, quitina e quitosana (Martins, 2008) .....	32
<b>Figura 19</b> - Esquema da desacetilação da quitina .....	33
<b>Figura 20</b> - Derivados de quitosana e quitina (Martins, 2008) .....	35
<b>Figura 21</b> – Espectro do infravermelho da QTS (a) e QTS-TPF (b) em pastilha de KBr (Laus, 2006) .....	36
<b>Figura 22</b> – Termogramas de TGA da QTS (a) e QTS-TPF (b), sob atmosfera de nitrogênio (Laus, 2006) .....	37
<b>Figura 23</b> - Estrutura do glutaraldeído (Sigma – Aldrich, 2012). .....	38
<b>Figura 24</b> - Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído (Mendes, 2009) .....	39
<b>Figura 25</b> - Espectros de infravermelho (FTIR) das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 3 horas (Carvalho,2012) .....	40
<b>Figura 26</b> - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 5 horas (Carvalho, 2012). .....	40
<b>Figura 27</b> - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 6 horas (Carvalho, 2012) .....	41
<b>Figura 28</b> - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com os melhores resultados da concentração de 8% GA com tempos 3, 5 e 6 horas (Carvalho, 2012) .....	41
<b>Figura 29</b> - (a) Detalhe da superfície das esferas de quitosana com 3% glutaraldeído obtido através de MEV 100 Kv 5.0 20 X (b) Superfície das esferas de quitosana imobilizadas com lipase CALB L (c) Esferas de quitosana imobilizadas com CALB L com glutaraldeído 3% v/v (Júnior, 2007) .....	42
<b>Figura 30</b> - Estrutura da epícloridrina (Sigma – Aldrich, 2012) .....	43

<b>Figura 31</b> - Estrutura química de quitosana reticulada com epícloridrina (Laus, 2011) .....	44
<b>Figura 32</b> – Voltamogramas cíclicos obtidos usando os biosensores propostos em solução tampão fosfato 0,1 mol L <sup>-1</sup> (pH 7,0) e velocidade de varredura 100 mv s <sup>-1</sup> . Voltamogramas (BI, BII e BIII) obtidos em H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2,0x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> e (I, II e III) em solução de hidroquinona 1,0x10 <sup>-4</sup> mol L <sup>-1</sup> e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2,0x10 <sup>-3</sup> mol L <sup>-1</sup> . Velocidade de varredura de 100 mV s <sup>-1</sup> (Oliveira, 2006) .....	46
<b>Figura 33</b> – Reator IKA-250 localizado no setor de polímeros LAMAV .....	50
<b>Figura 34</b> – Esquema do gotejador. (A) Adaptador de polietileno; (B) tubo de vidro interno, (C) tubo de vidro externo, (D) agulha hipodérmica. 1- Entrada da solução; 2- entrada de ar; 3- saída de ar (Dias, 2008) .....	52
<b>Figura 35</b> – Esquema formulado para a técnica de coagulação .....	53
<b>Figura 36</b> - Sistema tipo “copo de Payne” utilizado para medidas de permeabilidade .....	62
<b>Figura 37</b> - Método da gota séssil: medida dos ângulos de (a) avanço e (b) retrocesso (Sellin, 2002) .....	63
<b>Figura 38</b> – Goniômetro Ramé-Hart utilizado para medição dos ângulos .....	64
<b>Figura 39</b> – Filmes de quitosa; (A) filme de quitosana modificado, (B) filme de quitosa não modificado .....	68
<b>Figura 40</b> – Micrografias eletrônicas de varredura dos filmes de; (A) QTS pura e (B) QTS/EPC .....	68
<b>Figura 41</b> – Espectros de IR dos filmes densos de QTS e QTS/EPC .....	69
<b>Figura 42</b> – Esquema representativo da ligação covalente entre a EPC e o C <sub>6</sub> da QTS .....	70
<b>Figura 43</b> - Microscopia de força atômica mostrando a morfologia da superfície do filme denso de QTS .....	71
<b>Figura 44</b> - Microscopia de força atômica da topografia do filme denso de QTS com 5µm x 5µm de área .....	72

<b>Figura 45</b> - Microscopia de força atômica mostrando a morfologia da superfície do filme denso de QTS/EPC .....	72
<b>Figura 46</b> - Microscopia de força atômica da topografia do filme denso de QTS/EPC com 5µm x 5µm de área .....	73
<b>Figura 47</b> – Representação da ligação covalente entre a quitosana e a epicloridrina .....	74
<b>Figura 48</b> - Gráfico massa versus tempo do filme de QTS .....	75
<b>Figura 49</b> - Gráfico massa versus tempo do filme de QTS/EPC .....	75
<b>Figura 50</b> – Mostra da gota de água depositada sobre a superfície do filme de QTS (A); filme QTS/EPC (B) .....	78
<b>Figura 51</b> – Imagens de esferas de QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> em solução de hidróxido de sódio .....	79
<b>Figura 52</b> – Imagem das esferas de QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> após o processo de modificação com EPC. ....	79
<b>Figura 53</b> – Micrografia ótica (A), gráfico da distribuição das microesferas de Quitosana/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (B) .....	80
<b>Figura 54</b> – Micrografia ótica (A), gráfico da distribuição das microesferas de Quitosana-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /EPC(B) .....	81
<b>Figura 55</b> – Micrografias eletrônicas das microcápsulas (A) microesferas QTS-Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , (B) micrografia da superfície da microesfera QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	83
<b>Figura 56</b> – (A) microesferas QTS-EPC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , (B) micrografia de superfície da microesfera QTS-EPC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	84
<b>Figura 57</b> – Espectro de infravermelho QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (a) e QTS–EPC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> (b) .....	86
<b>Figura 58</b> – Curvas termogravimétricas do Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> estabilizado e das microcápsulas QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> e QTS-EPC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	87

<b>Figura 59</b> – Curvas de DSC das microcápsulas de QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> e QTS-EPC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .....	89
<b>Figura 60</b> – Distribuição de domínios de tempo de relaxação longitudinal (T <sub>1</sub> H) obtida por inversão-recuperação para a quitosana pura e modificada .....	90
<b>Figura 61</b> – Tempos de relaxação transversal (T <sub>2</sub> H) obtidos por solid-echo para a quitosana pura e modificada .....	91
<b>Figura 62</b> - Curva de magnetização para a magnetita (a) e magnetita atraída pelo imã (b) .....	92

## ÍNDICE DE TABELA

<b>Tabela 1</b> – Estabilidade da temperatura da lipase livre e imobilizada (Bussamara <i>et. Al.</i> , 2009) .....	15
<b>Tabela 2</b> - Estabilidade de pH da lipase livre e imobilizada (Bussamara <i>et. Al.</i> , 2009) .....	16
<b>Tabela 3</b> - Aplicações industriais das lipases (Silva, 2007) .....	20
<b>Tabela 4</b> – Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel (Silva, 2007) .....	21
<b>Tabela 5</b> – Valores de percentagem de conversão (c,%) em ésteres obtidos com lipases de diferentes fontes, imobilizadas na blenda PSS/PEO (80:20) (Dalla – Vecchia, 2004) .....	24
<b>Tabela 6</b> – Imobilização de enzimas em PANHEMA eletrofiado em membrana fibrosa (Huang, <i>et. al.</i> , 2007) .....	45
<b>Tabela 7</b> – Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície do filmes de QTS e QTS/EPC .....	71
<b>Tabela 8</b> – Coeficiente de permeabilidade ao vapor de água para filmes de QTS e QTS/EPC .....	76
<b>Tabela 9</b> - Medidas de ângulo de contato da quitosana de partida e modificada .....	77
<b>Tabela 10</b> – Distribuição de tamanho das microesferas .....	81
<b>Tabela 11</b> – Resultados obtidos na titulação .....	95
<b>Tabela 12</b> - Valores das atividades enzimática das enzimas Amano AK e Flip BR nos suportes poliméricos de partida e modificado .....	95

## ÍNDICE DE SÍMBOLOS

°C – Graus Celsius

ECH – Eplicloridrina

DTG – Derivada da Curva de perda de massa em função da temperatura

TGA – Análise termogravimétrica

TG – Termogravimetria

QTS – Quitosana

TPF – Tripolifosfato

P=O – Grupo fosfato

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

RMN -<sup>13</sup>C – Ressonância Magnética Nuclear do <sup>13</sup>C

FTIR – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier

NaOH- Hidróxido de sódio

-NH<sub>2</sub> – Grupo amina

-OH – grupo hidroxila

N<sub>2</sub> – Nitrogênio

MS – Espectrometria de Massa

GD – Grau de desacetilação

GA – Grau de acetilação

NCOCH<sub>3</sub> – Grupo N- acetil

NH<sub>3</sub><sup>+</sup> - Grupo amina protonado

Fe<sup>3+</sup> - Íons de ferro (III)

Fe<sup>2+</sup> - Íons de ferro (II)

NH<sub>2</sub> - Amina

NH<sub>3</sub> - Amônia

$E_{at}$  – Energia de ativação

$E_{cat}$  – Energia do catalisador

$E_p$  – Energia dos produtos

$E_r$  – Energia dos reagentes

$H_p$  – Entalpia dos produtos

$\Delta H$  – Diferença de entalpia

$CO_2$  – Dióxido de carbono (Gás carbônico)

pH – Potencial de hidrogênio

nm - Nanômetro

$Fe_3O_4$  - Magnetita

$Fe_2O_3$  - Maguenita

HCl – Ácido clorídrico

$CaCO_3$ – Carbonato de cálcio

KBr – Brometo de potássio

QTS – Quitosana

QTS/EPC – Quitosana/Epicloridrina

QTS/ $Fe_3O_4$  – Quitosana – magnetita

QTS-EPC/ $Fe_3O_4$  – Quitosana/Epicloridrina –magnetita

## RESUMO

A preocupação com a natureza e a sobrevivência do planeta virou meta de várias estruturas sociais. Devido a essa preocupação surgiu o termo sustentabilidade, o qual busca meios de adotar atitudes no cotidiano que sejam menos agressivas ao planeta. Dentre as perspectiva para o desenvolvimento sustentável e economicamente viável o setor biotecnológico no Brasil tem um espaço de particular importância na produção de biodiesel, onde são desenvolvidos estudos de novos suportes com propriedades magnéticas utilizando diferentes polímeros de origem natural.

O presente trabalho teve como objetivo a utilização de microesferas de quitosana com propriedades magnéticas modificadas com epícloridrina e posteriormente ativadas com glutaraldeído, com vista na sua utilização na imobilização das enzimas Amano Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) e a Spring Flip BR (*Fusarium oxysporum*) a serem incluídas como biocatalizador no processo de produção de bicombustíveis como parte de uma estratégia de desenvolvimento sustentável.

As microesferas de quitosana foram preparadas utilizando o método de coagulação. Foram caracterizadas com o auxílio das técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a distribuição de tamanho através de um microscópio óptico. Apresentaram uma distribuição de tamanho bastante regular e um ótimo formato esférico. Tais propriedades possibilitam a utilização dessas microesferas em um reator com leito fluidizado evitando a formação de caminhos preferenciais.

A modificação das microesferas foram acompanhadas utilizando as técnicas de caracterização estrutural por espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de baixo campo (RMN), termogravimetria (TGA), caloriometria diferencial exploratória (DSC) e ângulo de contato. Os resultados obtidos permitiram identificar o aparecimento de um novo material com propriedades mais rígidas, a modificação na mobilidade da cadeia polimérica assim como as mudanças no grau de hidrofobicidade da superfície.

Os experimentos de imobilização realizados mostram que os suportes desenvolvidos possuem um ótimo potencial de imobilização e podem ser utilizados como biocatalisadores em processos de transesterificação enzimática em reatores assistidos por campo eletromagnético

*Palavras chaves: Quitosana, Epicloridrina, Microesferas, Biocatalisadores,.*

## ABSTRACT

The concern about the nature and the survivor of our planet became a goal to several social structures. The term sustainability has emerged due to this preoccupation, searching for the adoption of new daily attitudes less aggressive to the planet. Among the prospect to the sustainable and economic viable development the biotechnological sector in Brazil has an area of particular importance in the biodiesel production, where studies about new bracket for biodiesel production with magnetic properties are developed using different polymers.

This work aimed the immobilization of Amano Lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) and Spring Flip BR (*Fusarium oxysporum*) enzymes, utilizing microspheres of chitosan with magnetic properties modified with epichlorohydrin and subsequently activated with glutaraldehyde, for the use as biocatalyst in the production process of biofuel as a part of a sustainable development strategy. The microspheres of chitosan were prepared using the coagulation method. They were characterized by the scanning electron microscopy (SEM) and their size dispersion by the optic microscopy. They have presented uniform size dispersion and a great spherical. Such properties have enabled the use of these microspheres in a fluidized bed reactor avoiding the formation of preferential pathways.

The microspheres modification was followed using the structural characterization techniques of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), low-field nuclear magnetic resonance (NMR), gravimetric analysis (TGA), differential scanning calorimetry (DSC) and contact angle. The results allowed the emergence of a new material with properties stricter, a modification on the polymeric chain mobility and also changes on the hidrophilicity level of the surface.

The experiments conducted show that the immobilization supports have developed a great potential for immobilization and can be used as biocatalysts in processes of transesterification reactor assisted by electromagnetic field.

Key words: Chitosan, Epichlorohydrin, Microspheres, Biocatalysts,

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A preocupação com a natureza e a sobrevivência do planeta virou meta de várias estruturas sociais. Devido a essa preocupação surgiu o termo sustentabilidade, o qual busca meios de adotar atitudes no cotidiano que sejam menos agressivas ao planeta, apresentando recursos naturais para gerações futuras.

A sustentabilidade é um ideal sistemático que se perfaz principalmente pela ação, e pela constante busca entre desenvolvimento econômico e ao mesmo tempo preservação do ecossistema. Podem-se citar medidas que estão no centro da questão da sustentabilidade ambiental: a aquisição de medidas que sejam realistas para os setores das atividades humanas (Abreu, 2010).

Os pontos elementares da sustentabilidade visam à própria sobrevivência no planeta, tanto no presente quanto no futuro. Esses princípios são: utilização de fontes energéticas que sejam renováveis, em detrimento das não renováveis. Assim sendo, o biodiesel surge como alternativa em relação ao petróleo e seus derivados.

Recentes pesquisas no Brasil buscam produzir o biodiesel de forma sustentável e economicamente viável. Um setor que vem apresentando uma vasta evolução em tais pesquisas é o setor de biotecnologia, onde são desenvolvidos estudos de novos suportes com propriedades magnéticas utilizando diferentes polímeros de origem natural, direcionados à utilização em processos de produção do biodiesel.

A quitosana é um polímero natural derivado da desacetilação da quitina, que por sua vez é o terceiro polímero natural encontrado em maior quantidade na natureza. A versatilidade deste polímero permite a preparação de microcápsulas de diferentes formas e tamanhos, envolvendo diversos produtos e derivados (Santos 2009).

Uma técnica que está sendo muito discutida entre vários autores é a modificação química dos polímeros utilizados como suporte. Normalmente essas modificações são realizadas para criar diferentes propriedades, que permitam um uso específico, no caso para imobilização de enzimas, e como matriz para transportadores magnéticos (Edgar et. al., 2001, Santos 2009).

O avanço no estudo dos suportes utilizados para a imobilização de enzimas e células indica a necessidade de desenvolver novos suportes cada vez mais efetivos centralizando a atenção nas características estruturais e superficiais do suporte e nas condições de imobilização da enzima, o que está intimamente ligada aos métodos de imobilização e nas características estruturais do suporte.

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar sua estabilidade.

## 1.1 – OBJETIVOS

### 1.1.1 – OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo modificar a quitosana quimicamente para a formulação e caracterização de suportes com propriedades magnéticas, com vista em utilizá-la na imobilização de enzimas a serem incluídas como biocatalizadores no processo de produção de bicompostíveis como parte de uma estratégia de desenvolvimento sustentável.

### 1.1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Formulação e caracterização de microcápsulas de quitosana com propriedades magnéticas e morfologia (casca / núcleo).
- Síntese e estabilização de nano magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), para sua utilização como núcleo magnético em suportes de enzimas.
- Modificação estrutural da quitosana, utilizando soluções de dois diferentes tipos de reticuladores: glutaraldeído e epicloridrina.
- Caracterização estrutural do polímero modificado com auxílio das técnicas de Espectroscopia de infravermelho (FTIR), Comportamento térmico (TG e DSC) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN-  $^1\text{H}$ ).
- Determinação das propriedades do polímero modificado e seu impacto na atividade da lipase imobilizada.

## 1.2 - JUSTIFICATIVAS

A crescente preocupação de implantar a sustentabilidade em todas as nações tem levantado discussões sobre novas fontes de energia. Em todo o mundo já se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, que causariam um impacto muito menor no aquecimento do planeta (Gonçalves et. al., 2005; Santos, 2009).

Atualmente, a procura por combustíveis tem aumentado muito. Assim sendo, o biodiesel surge como fonte alternativa em relação ao petróleo e seus derivados. Já que sua utilização pode melhorar a segurança energética e diminuir a poluição do ar, além de ser uma energia renovável (Furigo et. al., 2009; Santos, 2009).

O biodiesel sendo totalmente compatível com o diesel de petróleo em praticamente todas as suas propriedades, apresenta algumas vantagens em comparação com o combustível fóssil:

- É biodegradável;
- Gera redução nas principais emissões presentes nos gases de exaustão (com exceção de óxidos de nitrogênio);
- Possui um alto ponto de fulgor, o que lhe confere manuseio e armazenamento mais seguros;
- É derivado de matérias-primas renováveis, reduzindo assim a atual dependência sobre os derivados de petróleo e preservando as suas últimas reservas;
- Apresenta excelente lubricidade, fato que vem ganhando importância com o advento do petrodiesel de baixo teor de enxofre, cuja lubricidade é parcialmente perdida durante o processo de produção. A lubricidade ideal deste combustível pode ser restaurada através da adição de baixos teores de biodiesel.

Por outro lado o crescente desenvolvimento no setor biotecnológico tem sido um incentivo adicional à pesquisa científica, principalmente no Brasil, no sentido de desenvolver suportes com propriedades magnéticas utilizando diferentes polímeros de origem natural, direcionados à utilização em processos de produção do biodiesel.

Assim o presente trabalho será voltado para a utilização de um polímero natural, a quitosana, a partir do qual será desenvolvido um suporte catalítico que poderá ser aplicado em diversos ramos da biotecnologia e particularmente na imobilização de enzimas para produção de biodiesel.

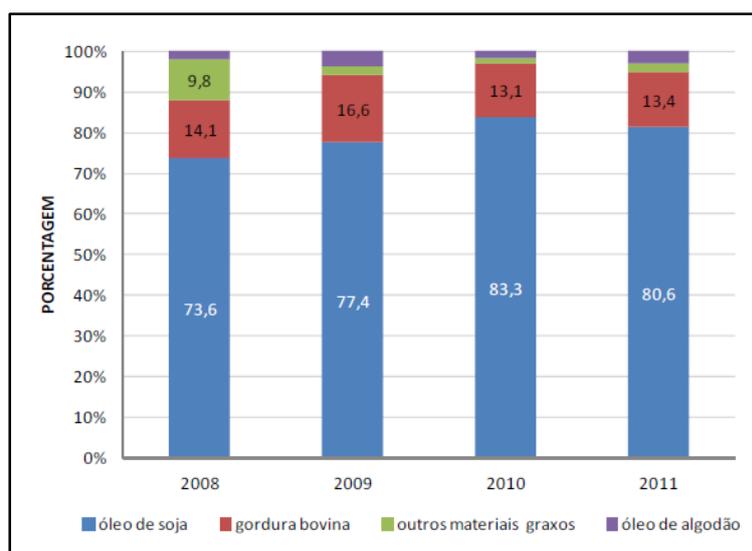
## CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – BIODIESEL

Pela Agência Nacional de Petróleo (2012) o biodiesel é definido como um mono alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, sendo um produto derivado de óleos vegetais ou gorduras animais. O seu conteúdo de energia e suas propriedades físicas e químicas são semelhantes ao óleo diesel convencional.

Segundo o Ministério de Minas e Energia (2012) o óleo de soja vem, desde 2005, sendo o insumo mais importante para a produção de biodiesel, este alto interesse se dá pela existência de várias espécies de oliginosas encontradas no Brasil, onde em meio a tanta diversidade se destacam os óleos extraídos da mamona, dendê, canola, girassol, amendoim e as sementes de algodão.

Em relação aos óleos extraídos dos sebos bovinos e suínos, estes ocupam a segunda colocação de interesse para a produção de biodiesel no país. A Figura 1 apresenta a evolução da utilização das diferentes matérias primas utilizadas no processo de fabricação de biocombustíveis nos últimos anos.



**Figura 1** – Matérias-primas utilizadas para produção de biodiesel (ANP, 2012).

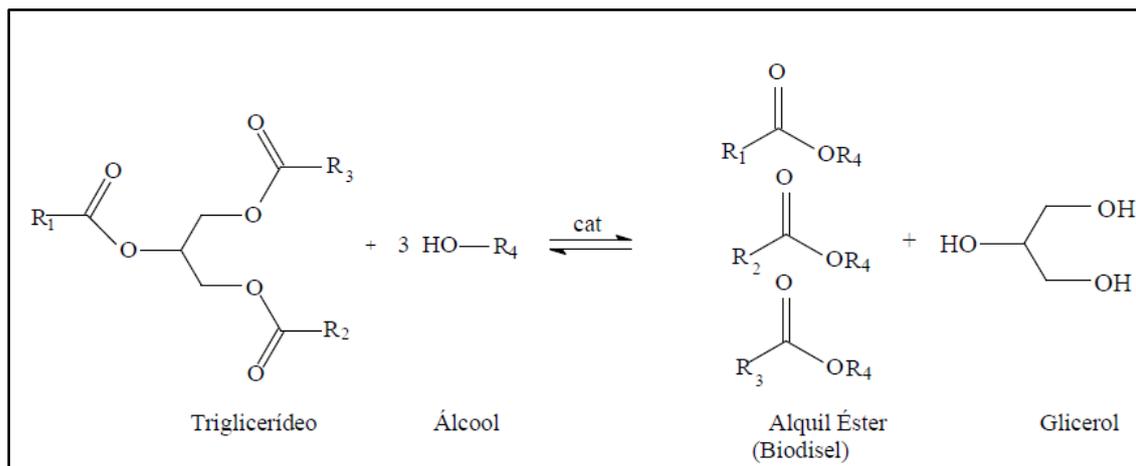
Em 2003, o Brasil dá um grande passo, iniciando seus primeiros estudos concretos sobre o biodiesel, surgindo a necessidade de criar uma política de controle para a produção e o uso de biocombustíveis e, em dezembro de 2004, o governo nacional lança então o Programa Nacional de Produção e Uso do Biodiesel (PNPB), onde na etapa inicial, o objetivo principal era introduzir na matriz energética brasileira o biodiesel, com enfoque na economia e no desenvolvimento social e sustentável (ANP, 2012).

No ano de 2008 entra em vigor uma nova lei, que legalmente autoriza a mistura de biodiesel ao diesel convencional (fóssil). A esta mistura denominou-se de diesel BX, onde, X é o percentual de biocombustível adicionado ao diesel de petróleo, mas com o amadurecimento do mercado brasileiro em relação ao excessivo consumo de combustíveis, esse percentual teve uma ampliação bem significativa, e em, 2010, o Conselho Nacional de Política Energética (CNPE) estabeleceu então, que em todo território nacional era obrigatório a introdução de 5%(B5) de biodiesel na produção de combustíveis fósseis (ANP, 2012; MME, 2012).

Com a criação da política do biodiesel e das implementações de novas leis, hoje em dia, a iniciativa privada tem demonstrado um grande interesse no desenvolvimento e no crescimento da produção de biocombustíveis, onde são realizados investimentos em novos laboratórios, em novas pesquisas de produção, na descoberta de novas matérias primas, isso tudo, levando em conta, a segurança do meio ambiente, desenvolvendo novas metas de sustentabilidade, proporcionando uma legalidade na produção do biodiesel.

### 2.1.1 - PRODUÇÃO DE BIODIESEL POR TRANSESTERIFICAÇÃO

O processo químico conhecido por transesterificação, atualmente, é o mais utilizado para a produção de biodiesel. O início se dá pela mistura de um óleo vegetal ou animal com um álcool (etanol ou metanol), onde o sistema é estimulado por um catalisador (ácido, básico ou enzimático). Nesse processo, tem como produto final a formação de um éster metílico de ácido graxo (biodiesel) e a glicerina como um subproduto (utilizado no mercado de sabões).



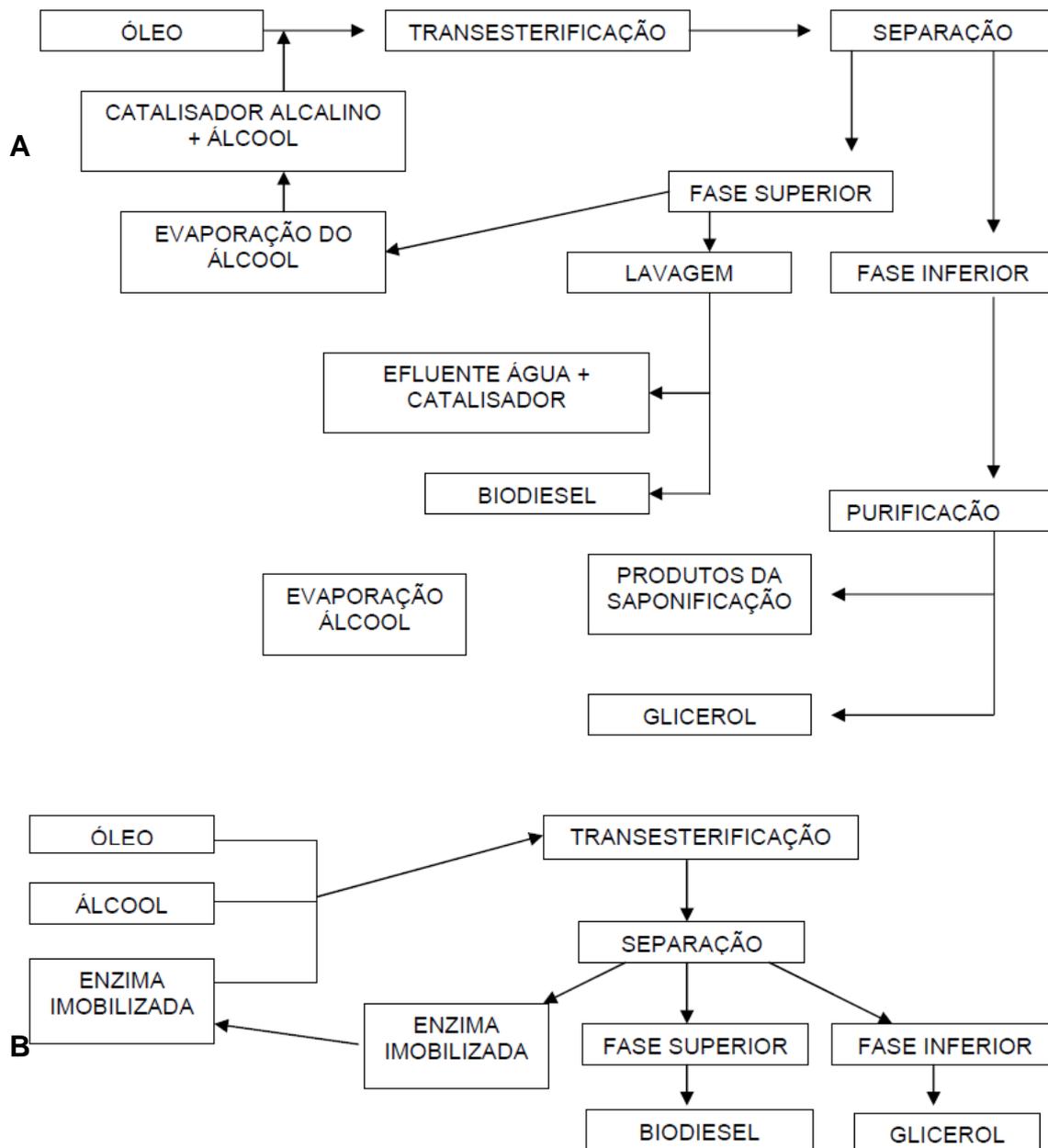
**Figura 2** – Esquema resumido da produção de biodiesel (Martins, 2008).

Rodrigues 2009, afirma que, é necessário 3 mol de álcool para cada mol de triglicerídeo, para que o processo de transesterificação realmente aconteça e com isso, como produto é produzido 1 mol de glicerol e 3 mol de ésteres de ácidos graxos (Biodiesel), sendo que, neste caso se utiliza um catalisador químico, tratando-se de uma base (hidróxido de potássio – KOH ou hidróxido de sódio – NaOH), com uma concentração de 1% por peso de óleo (Yazdani& Gonzalez, 2007; Hanet.al.,2009).

O processo de transesterificação ainda existem várias desvantagens quando se utiliza um catalisador químico. O descarte desses catalisadores se torna o maior problema encontrado, pois dependendo da composição química do catalisador escolhido, o dano da contaminação ao meio ambiente pode ser muito grave, levando em conta, que em alguns casos, pode ocasionar também a contaminação de seres humanos (Santos, 2009; Rodrigues, 2009).

Vários estudos vêm sendo colocado em prática, em se tratando da utilização de catalisadores biológicos, a fim de substituir os catalisadores químicos, fazendo com que as desvantagens ocasionadas pelo mesmo, sejam então removidas.

Na figura 3 segue dois esquemas representativos de uma reação de transesterificação para a produção de biodiesel, sendo que no primeiro esquema (A), usa-se um catalisador alcalino e no segundo (B), usa-se um catalisador enzimático.



**Figura 3** – Processo de produção de biodiesel por transesterificação; **(A)** usando catálise alcalina; **(B)** usando catálise enzimática (Rodrigues, 2009).

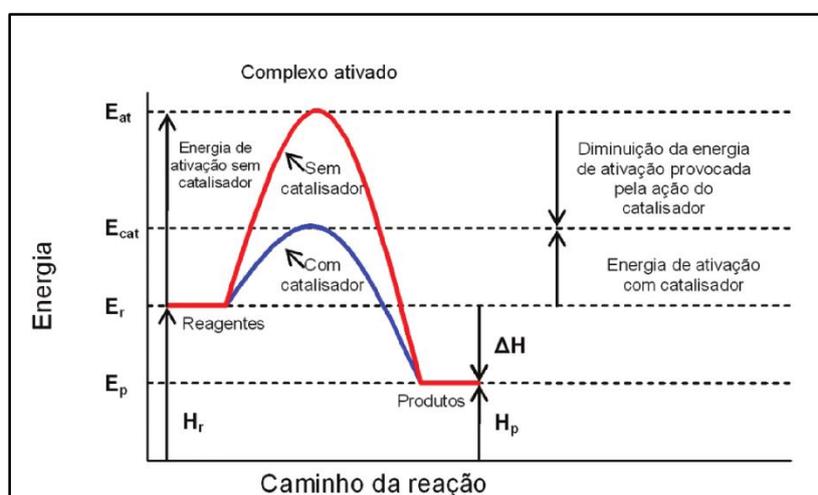
Optando por utilizar um catalisador enzimático no lugar de um alcalino, conseguimos eliminar algumas etapas de produção do biodiesel. Com essas eliminações é possível obter um produto com alto grau de pureza, há uma diminuição no consumo de energia, não ocorre o risco de contaminação dos afluentes por causa do catalisador, tornando o sistema ecologicamente correto e o mais importante e que no final do processo, o catalisador é recuperado, proporcionando sua reutilização (Rodrigues, 2009).

## 2.2 – BIOCATALISADORES

Em muitas reações (ou processos), químicos e biológicos, existem moléculas que facilitam a interação entre os reagentes – os **catalisadores**.

Os biocatalisadores são catalisadores, como o próprio nome indica, em reações químicas nos organismos vivos. São considerados biocatalisadores as enzimas, os hormônios e as vitaminas.

Segundo Fogler 2012, enzimas são proteínas ou substâncias proteicas com uma elevada massa molecular, sendo responsáveis por catalisar reações químicas que ocorrem nos sistemas biológicos, sua função é aumentar a velocidade de atuação, em relação as reações que não são submetidas a um catalisador, com isso, as enzimas reduzem a energia de ativação, promovendo então, uma rota “alternativa” no curso da reação (Figura 4). Além disso, o papel da enzima é apenas fazer parte da reação, ou seja, ela só promove a ação da reação, não sendo, de hipótese alguma consumida pela reação, não afetando o produto final.



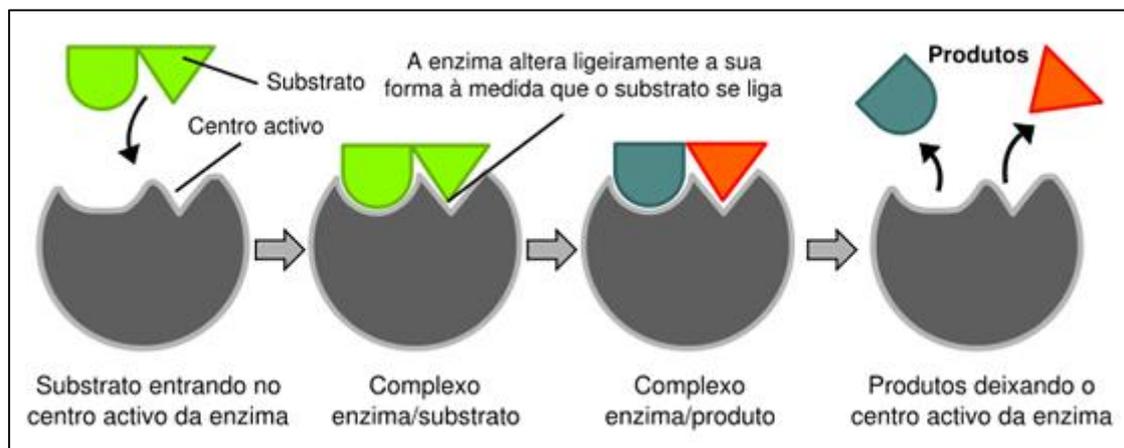
**Figura 4** – Representação da atividade de um catalisador numa reação química

Na figura 4 podemos observar que:

- $E_{at}$  – energia de ativação
- $E_{cat}$  – energia do catalisador

- $E_p$  – energia dos produtos
- $E_r$  – energia dos reagentes
- $H_p$  – entalpia dos produtos
- $\Delta H$  – diferença de entalpia

No esquema a seguir mostra o mecanismo da catálise enzimática conhecido por “chave-fechadura”, onde a enzima interage com um substrato formando um intermediário ativo, conhecido também como complexo enzima-substrato. Após a reação, o complexo formado se desfaz, liberando o produto formado e dando lugar para novos substratos e assim, formando novamente novos complexos (SoBiologia, 2013).

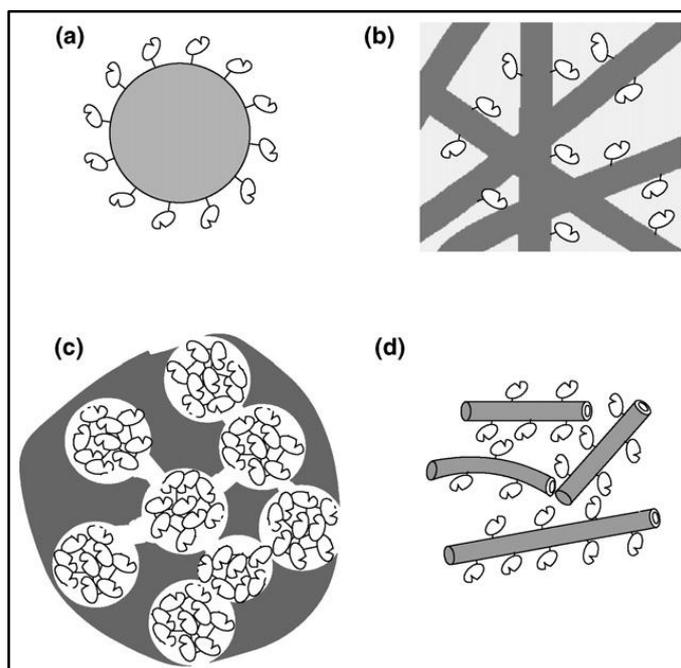


**Figura 5** – Mecanismo de atuação das enzimas (SoBiologia, 2013)

Uma outra característica muito importante das enzimas é que elas possuem uma grande especificidade, isto é, atuam somente com um determinado substrato, em condições brandas: pH em torno de 4 a 9 e temperatura de 25°C a 70°C, se ultrapassar essa temperatura as enzimas começam a se deteriorar.

O setor biotecnológico vem tendo um grande interesse em pesquisas com o desenvolvimento de novos biocatalizadores, utilizando enzimas imobilizadas em vários suportes, visando o melhoramento da área de superfície dos biocatalizadores, sua resistência na transferência de massa e a carga eficaz da enzima.

Wang 2006 cita em seu trabalho que a aplicação de enzimas imobilizadas utilizadas como biocatalizadores, sendo elementadas a materias em nanoescala (nanopartículas, nanotubos, nanofibras e matrizes nanoporosas), proporcionaos limites superiores da catalise, equilibrando os principais fatores que determinam a eficiência dos biocatalisadores. Este efeito foi relatado pela primeira vez, no final de 1980, sendo que o primeiro grupo de nanomateriais a serem empregados para biocátalise foram nanopartículas feitas de magnetita, silica e ouro.

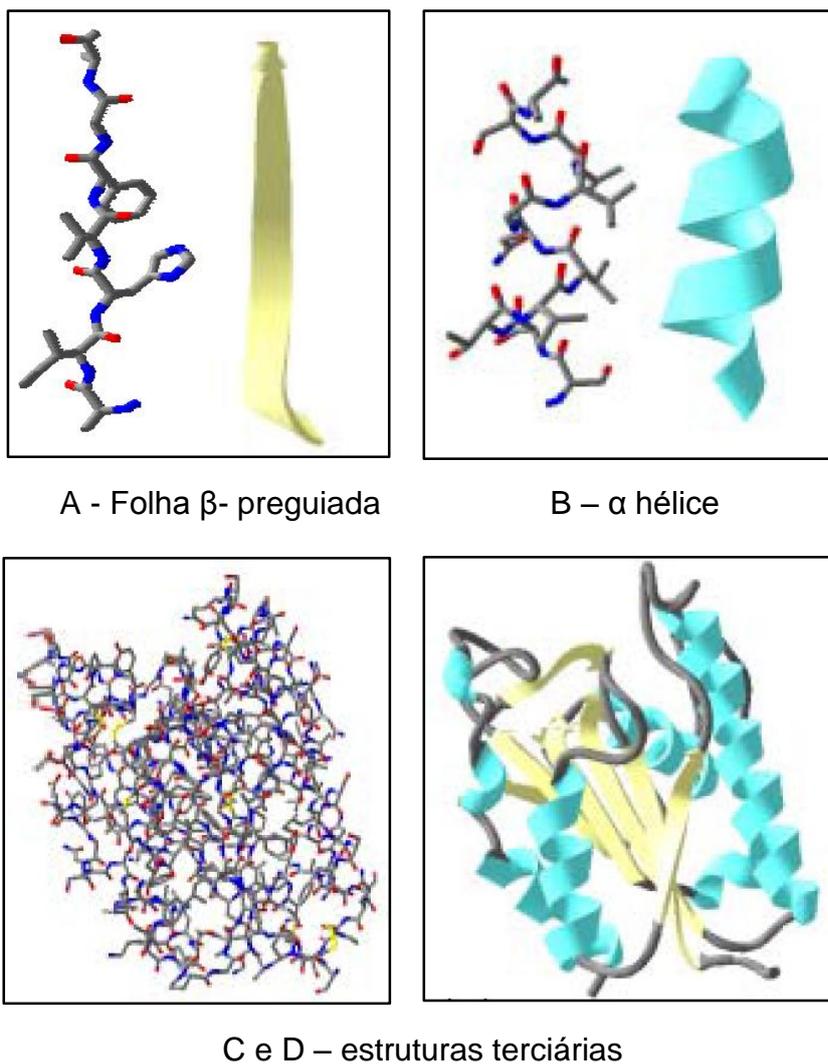


**Figura 6** - Estruturas básicas de biocatalisadores em nanoescala.(a)com Nanopartículas de superfície ligados enzimas. (b)realização Nanofibras enzimas. (c)Matriz nanoporosa com enzimas aprisionadas. (d) nanotubos de carbono enzimas materiais híbridos (Wang, 2006).

### 2.2.1 –CATÁLISE ENZIMÁTICA

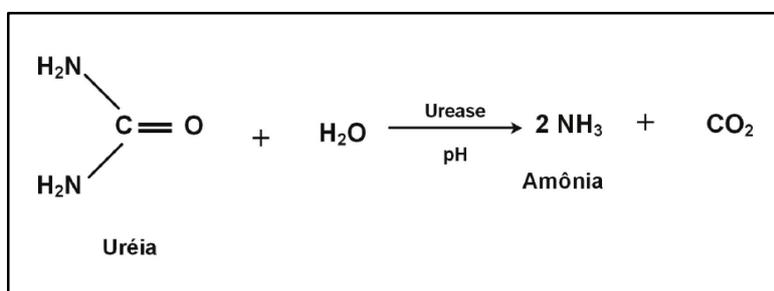
Como já sabemos que todas as enzimas são proteínas, mas nem todas as proteínas são enzimas, a maior parte deste grupo funcionam como catalisadores de reações químicas, tendo uma ocupação de destaque na dinâmica e na estruturação dos organismos vivos (Moreira, 2003).

Em sua longa cadeia as enzimas possuem blocos de construção que são denominados de aminoácidos, que por sua vez, são ligados por ligações peptídicas formando cadeias lineares, caracterizando sua estrutura primária. Levando em conta apenas a sua estrutura primária as enzimas seriam moléculas longas e muito finas, mas muitas delas, apresentam formas globosas, evidenciando estruturas de ordem superior, denominadas de estruturas secundárias, terciárias e quaternárias (Moreira, 2003)



**Figura 7-** Representações gráficas das estruturas tridimensionais secundárias (A e B) e terciárias (C e D) obtidas por Raio – X da lipase de *Penicillium* (Moreira, 2003).

Antes mesmo dos pesquisadores saberem do alto poder das enzimas como catalisadores biológicos, povos antigos já conheciam e usavam as enzimas gradualmente na produção de bebidas, alimentos e até mesmo na medicina (Trevisan, 1993; Santos, 2009). Mas foi em 1926, que o cientista e pesquisador James Sumner's, teve a capacidade de cristalizar a uréase por meio da catálise de hidrólise (Figura 8), onde descobriu que a uréase é composta por cadeias de aminoácidos, formando uma estrutura tridimensional, estrutura muito semelhante as da proteínas (Dalla – Vecchia et. al., 2004).



**Figura 8** – Esquema da reação de hidrólise da ureia (Almeida et. al., 2008).

Existem alguns fatores que podem influenciar no processo da catálise enzimática, ocasionando uma diminuição ou até mesmo a inibição total da atividade. Os fatores que mais podem sofrer variação no processo catalítico é o pH do meio reacional, a temperatura que o sistema é proporcionado no momento da reação, a concentração da solução enzimática e em alguns casos e possível cessar totalmente a atividade, usando inibidores (Salvador et. al. 2009).

Tais fatores mencionados, podem ser corrigidos, controlados ou até mesmo adaptados, levando em conta o tipo de enzima a ser utilizada, qual a reação de catalise que esta enzima irá proporcionar e qual substrato e o mais adequado para o sistema.

Bussamara et. al., 2009 apresenta em seu trabalho fatores que afetam a catálise enzimática da enzima *Pseudozyma hubeiensis* (strain HB85A) utilizada como biocatalisador na produção do biodiesel. Focando na variação de pH do

meio, da temperatura e do tempo. Tais fatores foram comparados entre a enzima na sua forma livre e imobilizada.

Na Tabela 1 a estabilidade térmica da lipase livre e imobilizada foi testada por incubação durante um intervalo de temperatura de 1 hora e 2 horas. Seus resultados mostraram que a lipase imobilizada apresentou melhor estabilidade térmica no intervalo de 30°C a 60°C, havendo um ligeiro decréscimo nos valores da atividade residual em 1h seguido de um aumento da atividade residual em 2h. Assim, a lipase imobilizada foi mais estável do que a dissolução da enzima solúvel aumentando o acesso de forma eficaz para o sítio ativo da enzima imobilizada.

**Tabela 1** - Estabilidade da temperatura da lipase livre e imobilizada (Bussamara *et. Al.*, 2009).

Temperatura	Tempo	Atividade residual (%) Lipase livre	Atividade residual (%) Lipase imobilizada
Controle		100	100
30 °C	1h	63 ± 0.53	90 ± 11.5
30 °C	2h	50 ± 8.24	102 ± 15.1
40 °C	1h	61 ± 10.65	168 ± 8.7
40 °C	2h	51 ± 2.35	91 ± 9.0
50 °C	1h	74 ± 7.9	99 ± 9.1
50 °C	2h	85 ± 0	227 ± 0
60 °C	1h	63 ± 5.09	61 ± 7.3
60 °C	2h	87 ± 5.23	143 ± 0
70 °C	1h	54 ± 2.44	75 ± 10.4
70 °C	2h	53 ± 0	123 ± 3.7

Já na Tabela 2, a estabilidade da lipase livre e imobilizada foi investigada variando o pH 3,0-9,0, na ausência de substrato. Depois de 1 ou 2 horas a 50°C a atividade residual foi medida a 68°C e pH 4,6 para a lipase livre e 52°C e pH 6,0 para a lipase imobilizada. A lipase imobilizada, em toda faixa de pH foi mais estável em comparação com a enzima livre. Isto pode ser devido à interação direta entre a lipase e os suportes usados, que permite uma

conformação adequada facilitando sua atividade ou durante a imobilização a enzima poderia estar com o seu sítio ativo totalmente exposto ao meio de reacional.

**Tabela 2** – Estabilidade de pH da lipase livre e imobilizada (Bussamara *et. Al.*, 2009).

Temperatura	Tempo	Atividade residual (%) Lipase livre	Atividade residual (%) Lipase imobilizada
Controle		100	100
3.0	1h	189 ± 8.5	39 ± 2.7
3.0	2h	155 ± 0	100 ± 6.0
4.0	1h	63 ± 7.7	79 ± 2.6
4.0	2h	52 ± 9.2	69 ± 13.1
5.0	1h	102 ± 7.2	310 ± 8.1
5.0	2h	83 ± 2.1	239 ± 10.1
6.0	1h	93 ± 3.2	106 ± 8.8
6.0	2h	70 ± 11.6	97 ± 10.8
7.0	1h	115 ± 0	171 ± 3.2
7.0	2h	117 ± 13.7	150 ± 0.1
8.0	1h	79 ± 8.8	192 ± 7.9
8.0	2h	99 ± 9.2	143 ± 5.9
9.0	1h	25 ± 12.3	386 ± 7.3
9.0	2h	39 ± 10.9	97 ± 7.4

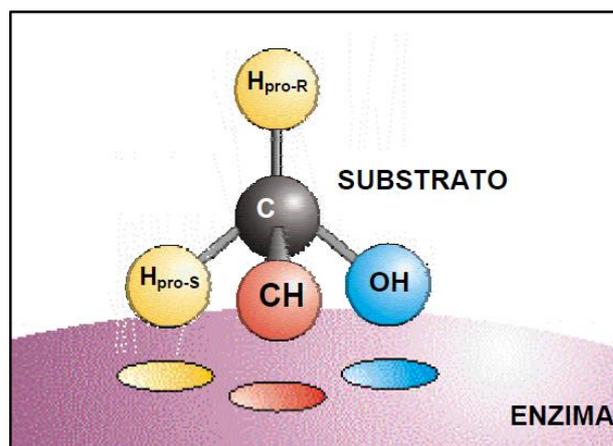
### 2.2.1.1 – ATUAÇÃO DAS ENZIMAS

Não havendo hoje em dia, uma teoria mais simples, onde a atividade e a especificidade das enzimas no processo catalítico, seja explicada claramente, pesquisadores vêm tentando explicar vários fenômenos baseando-se em resultados obtidos através de experimentos, que combinados com outros resultados, conferem a essas enzimas, características bem específicas e de fácil entendimento.

Trevisan 1993, relata em seu trabalho que as ligações (enzima – substrato), são formadas devido a forças de atração fracas, a mais comum sendo as pontes de hidrogênio, mas algumas, são capazes de fazer ligações do tipo covalente. Acredita-se que apenas uma pequena fração da enzima

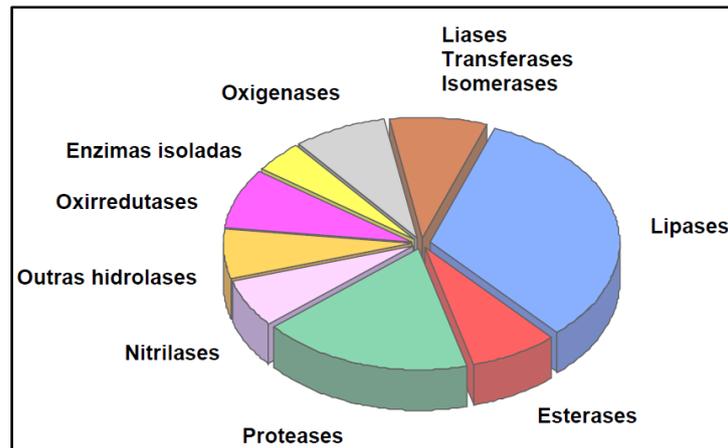
participa do sítio ativo, sendo que o restante dos aminoácidos determina a estrutura espacial (terciária) adequada para a catálise.

A característica que marca as enzimas, como já foi comentado, é a sua especificidade, ainda mais se tratando das enzimas que são produzidas pelos organismos vivos, pois essas, catalisam apenas um tipo de reação no qual foram predestinadas. Essa especificidade se dá pelas ligações formadas entre os aminoácidos, caracterizando a cadeia enzimática na configuração do tipo L, proporcionando assim, uma melhor interação do sitio ativo da enzima com o substrato. Mas quando um aminoácido, apresenta um carbono  $\alpha$  simétrico em sua cadeia (Figura 9), faz com que, eles não tenham nenhuma interação com os de formas idênticas (configuração do tipo D) (Moreira, 2003).



**Figura 9** – Modelo da ligação específica de um substrato pró-quiral ao sitio ativo da enzima (Moreira, 2003).

Moreira 2003 cita em seu trabalho, o destaque que as enzimas hidrolíticas tem sobre as demais enzimas, em relação ao seu uso na bioconversão de lipídeos em biocombustíveis. Na classe das enzimas hidrolíticas, as lipases tem um destaque maior entre os pesquisadores, pois essas enzimas, são de fácil obtenção, tem custo baixo, promovem uma catálise mais simples produzindo um produto mais puro.

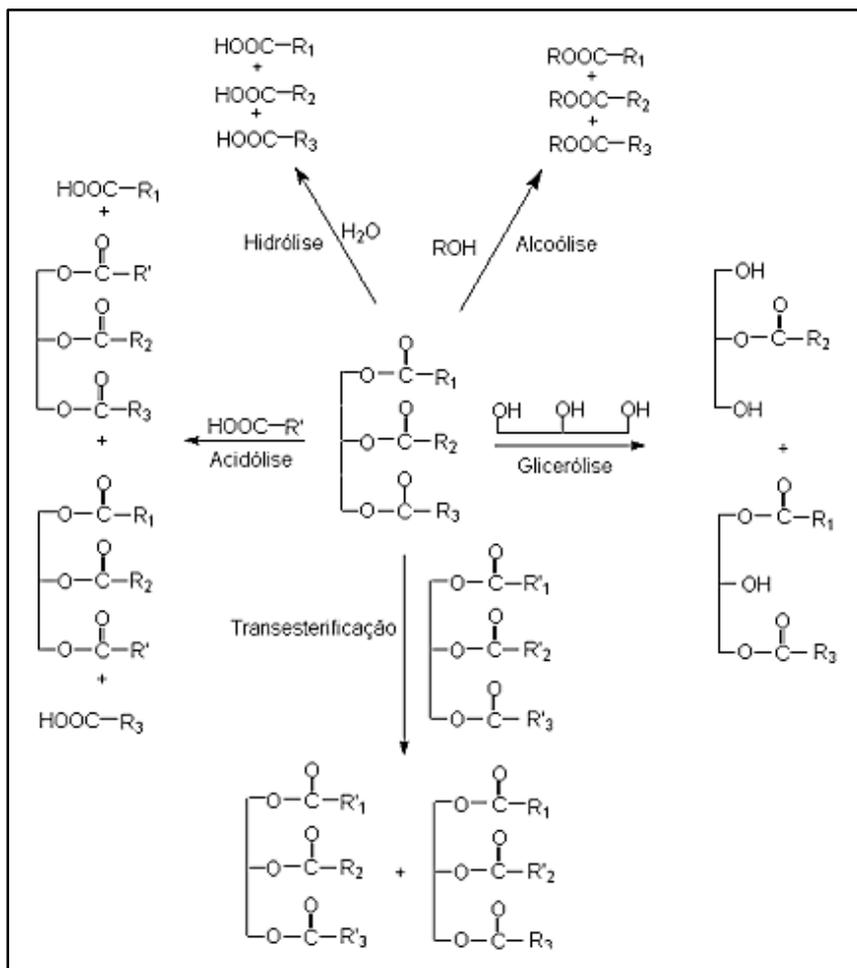


**Figura 10** - Utilização relativa das enzimas em biotransformações (Moreira, 2003)

### 2.3 – LIPASE

As Lipases (Triacilglicerolacil- hidrolases, EC. 3.1.1.3) são enzimas que atuam na bioconversão de triglicerídeos em ácidos graxos livres, através do processo de hidrólise. O peso molecular das enzimas pode variar em torno de 40 a 50 Kda, tendo origens tanto de fungos ou bacterianas (Moreira, 2003; Bajaj et. al.; Rodrigues, 2009).

Em certos casos, as Lipases são capazes de catalisar outros tipos de reação, além da convencional (hidrolise). Na síntese em solventes orgânicos, são capazes de realizar reações de esterificação, interesterificação, transesterificação, alcoólise e aminólise (Figura 11), em outros casos, as lipases podem atuar sobre substratos não naturais (Jaegr e Eggert, 2002; Moreira, 2003; Rebelo, 2009).



**Figura 11** – Representação esquemática das reações catalisadas por lipase (Castro et. al., 2004).

Além de serem usadas na bioconversão de óleos em biocombustíveis, as lipases estão tendo uma ampla atuação em escala industrial, tendo um papel muito importante e um alto interesse, destacando-se nas indústrias alimentícias, cosméticos, biomédicas, pesticidas e entre outras (Tabela 3) (Breuer et. al. 2004; Rebelo 2009). E a cada nova pesquisa realizada, as enzimas vão conquistando um outro setor muito importante, o meio acadêmico, que vem tendo vários artigos publicados.

**Tabela 3**– Aplicações industriais das lipases (Silva, 2007).

Setor	Aplicação	Produto
<b>Alimentício</b>		
Laticínio	Hidrólise da gordura do leite	Agente aromatizante para manufatura de produtos lácteos
Panificação	Melhoramento do sabor/qualidade, prolongamento do tempo de prateleira.	Confeitos e bolos
Bebidas	Melhoramento do aroma e aceleração da fermentação, por remoção de lipídios.	Bebidas alcoólicas, Ex: saquê, vinho e outras.
Processamentos do derivado do ovo	Melhoramento da qualidade do ovo por hidrólise dos lipídios.	Maionese, molhos e cremes.
Processamento de carne e peixe	Desenvolvimento de aroma e remoção de excesso de gordura.	Produtos embutidos.
Processamento de óleos	Transesterificação de óleos naturais, hidrólise de óleos.	Óleos e gorduras modificadas (Subst. Da manteiga de cacau)
<b>Químico</b>		
Química fina	Síntese de ésteres	Ésteres
Detergentes	Remoção de manchas de gorduras de alimentos	Detergentes
Farmacêutico	Digestão de óleos e gorduras de alimentos	Digestivos
Analítico	Análise de triglicerídeos no sangue	Diagnóstico
Cosmético	Remoção de lipídios	Cosméticos em geral
Curtume	Remoção de gordura das peles dos animais	Produtos de couro
Diversos	Decomposição e remoção de substâncias oleosas	Limpeza de tubulação, tratamento de efluentes e outros, em combinação com outras enzimas.

As enzimas que são estudadas e usadas no processo de catalise na produção de biodiesel têm a origem microbiana, tendo como destaque no meio acadêmico a *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Burkholderiacepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucormiehei* (Rodrigues, 2009).

As razões que levam a essas enzimas, serem cada vez mais estudadas e empregadas como biocatalisadores, e que existem fatores que podem explicar o seu enorme potencial biotecnológico:

- São estáveis em solventes orgânicos;
- Não necessitam de co- fatores;
- Possuem uma grande especificidade de substrato;
- Exibem uma alta enantioseletividade;
- Atuam em uma faixa de pH relativamente grande.

Apesar de serem ainda pouca utilizadas para a bioconversão, as lipases vem apresentando uma enorme vantagem em relação aos catalisadores químicos convencionais (Tabela 4).

**Tabela 4** - Vantagens e desvantagens do processo químico e enzimático na produção de biodiesel. (Silva 2007)

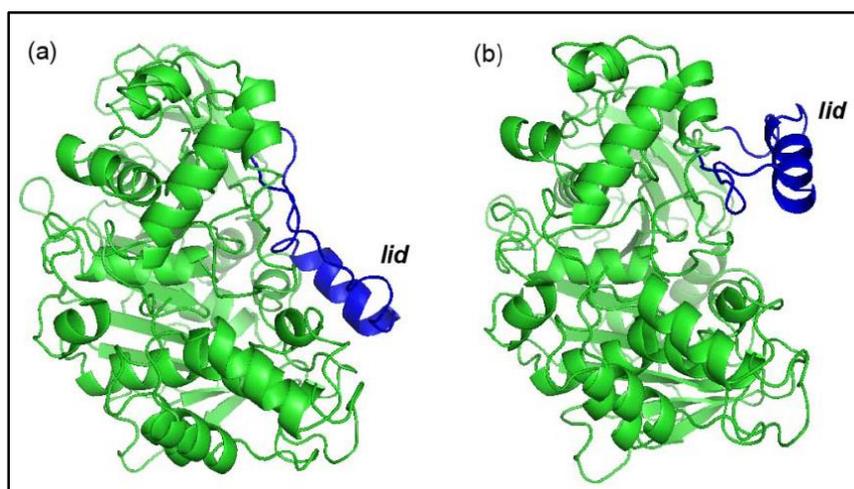
<b>Processos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Químico	Simplicidade	Dificuldade de separação do catalisador
	Alto rendimento	Impossibilidade de reutilização do catalisador
	Curto tempo de reação	Dificuldade de utilização de etanol hidratado Obtenção de produtos com menor grau de pureza
Enzimático	Facilidade de separação do catalisador (Suporte)	Longo tempo de reação

### 2.3.1 – MECANISMO DAS LIPASE

O mecanismo de atuação das enzimas é de fácil explicação, pois se baseia na sua estrutura na sua estrutural tridimensional e principalmente pelo seu sitio ativo. Esse tipo de mecanismo é conhecido como ativação interfacial, podendo ser uma grande influência na hora da catalise enzimática.

O sítio ativo de uma enzima desempenha um papel muito importante no processo catalítico, pois é por meio dele que a enzima consegue ter uma interação com o substrato. O sitio ativo de uma lipase é formado por um complexo acil-enzima. (Rodrigues, 2009).

Para haver a interação com o sitio ativo, o substrato enfrenta alguns obstáculos, tendo como o principal deles uma cadeia polipeptídica hidrofóbica, que possui uma forma de  $\alpha$  hélice, denominada de “*tampa*” ou “*lid*”. Quando o substrato não consegue interagir com o sitio ativo, falamos que a enzima se encontra na sua forma fechada, pois o lid está recobrendo o sitio ativo, impedindo seu contato com o substrato. Mas quando há uma interação interfacial através do complexo (lipídio/água), o substrato consegue então interagir com o sitio ativo da enzima, pois essa interação faz com que aconteça um rearranjo na cadeia da enzima, deslocando o lid, deixando o sitio ativo exposto ao meio reacional. A esse mecanismo, podemos dizer que a enzima se encontra na sua forma aberta (Rodrigues, 2009; Carvalho, 2012).



**Figura 12** – Conformações estruturais da lipase *Candida rugosa*. (a) Conformação fechada; (b) Conformação aberta (Rodrigues, 2009).

Quando a lipase se encontra em um ambiente favorável, havendo uma enorme disponibilidade da área interfacial, a atividade enzimática terá um rendimento melhor, provando sua eficácia. Esse aumento de disponibilidade, se dá quando há formação de gotas de óleo com presença de água, mas se houver um excesso de água no meio reacional, as lipases vão preferir fazer a catalise de hidrolise ao invés de realizar a de transesterificação, neste caso, tem que haver um equilíbrio de água no sistema para que isso não aconteça (Carvalho, 2012).

## 2.4 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O primeiro relato que se conhece na tentativa de se imobilizar uma enzima, foi em 1953, quando os pesquisadores Grubhofer e Schleith, imobilizaram enzimas em suportes de poliaminopoliestirenodiazotizada (resina), tendo como objetivo principal, o melhoramento das propriedades das enzimas (Trevisan, 1993).

A parti daí, os interesses em estudar e pesquisar sobre a imobilização de enzimas em suportes poliméricos, está tendo um aumento gradativamente, nos setores industriais e principalmente no setor biotecnológico, que vem mostrando um interesse na utilização de catalisadores enzimáticos, em detrimento aos catalisadores químicos.

A definição de imobilização de enzimas, é simplesmente o seu aprisionamento em uma matriz polimérica, havendo vários suportes e métodos que possa ser utilizado (Silva, 2007). Assim como todo processo, o método de se imobilizar enzima também existe suas vantagens e desvantagens.

Essas são as principais vantagens, quando se imobiliza uma enzima

- O aumento da estabilidade térmica do biocatalisador;
- Aplicação em reatores com maior controle do processo;
- Reutilização do biocatalisador, sem perda significativa da sua atividade catalítica (Mendes, 2009).

Essas são as desvantagens, que podem ocorrer na imobilização:

- Alteração da conformação nativa da enzima;
- Custo do suporte;
- Perda de atividade durante o processo de imobilização (Mendes, 2009).

O objetivo principal em imobilizar enzima, nada mais é, que obter um biocatalisador mais eficaz, onde a atividade da enzima imobilizada seja maior do que a enzima na sua forma livre, levando em conta o método a ser utilizado, pois este não poderá afetar de forma alguma a estrutura da enzima, caso ao contrário, a atividade será afetada parcialmente ou totalmente inibida (Dalla-Vecchia, 2004; Nascimento, 2004).

Na Tabela 5 Dalla-Vecchia mostra seus resultados obtidos a partir da imobilização de lipases em blenda de PSS/PEO 80:20, para obter laurato de n-pentila. Os melhores rendimentos foram obtidos com as lipases de *Mucormiehei* e de *Rhizopusoryzae*(Amano F-AP 15), 80 e 98%, respectivamente. As demais lipases obtiveram rendimentos inferiores a 50%, este resultado pode estar relacionado com a atividade diferenciada de cada lipase ou a interação entre enzima e suporte.

**Tabela 5.** Valores de percentagem de conversão (c,%) em ésteres obtidos com lipases de diferentes fontes imobilizadas na blenda PSS/PEO (80:20)(Dalla – Vecchia, 2004).

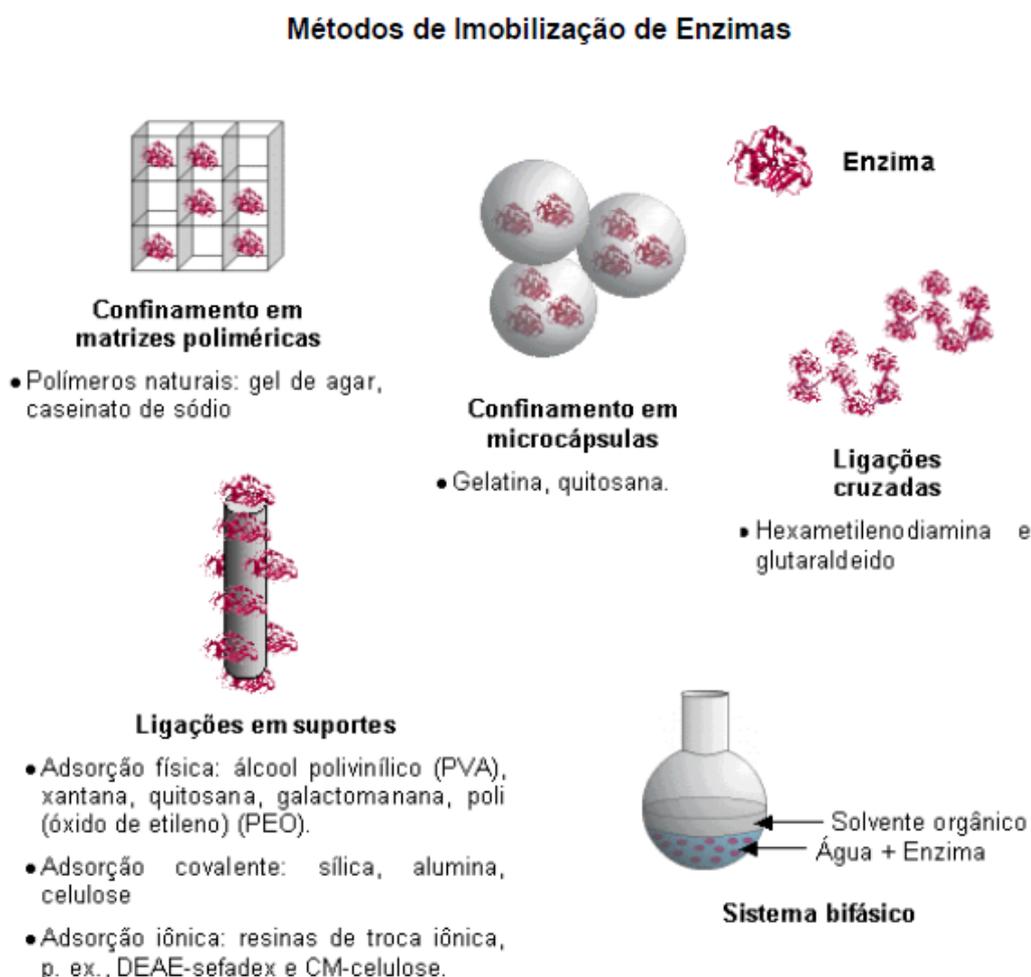
Enzimas	Sigla	Conversão (%)*
<i>Mucorjavanicus</i> <sup>b</sup>	M	6
<i>Candidarugosa</i> <sup>b</sup>	AY	9
<i>Pseudomonassp</i> <sup>b</sup>	LPS	13
<i>Candidarugosa</i> <sup>c</sup>	LCR	22
<i>Pancreatica de porco</i> <sup>c</sup>	LPP	25
<i>Aspergillusniger</i> <sup>b</sup>	A	28
<i>Greasex</i> <sup>TM</sup>		28
<i>Rhizomucormiehei</i> <sup>d</sup>	LIZ	38
<i>Thermomyceslanuginosus</i> <sup>d</sup>	LIL	38
<i>Mucormiehei</i> <sup>d</sup>	PAL	80
<i>Rhizopusoryzae</i> <sup>b</sup>	F- AP15	98

\*obtida por RMN1H, [enzima]: 50 mg/g suporte, tempo de reação: 24 h, solvente: n-hexano; (b) Amano; (c) Sigma e (d) Novozymes.

## 2.4.1 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

Existem vários métodos para se imobilizar enzima (Figura 13), onde a escolha depende muito do tipo de enzima que será imobilizada, além disso existem fatores que podem influenciar na hora de fazer a escolha do método, por exemplo: o tipo da catalise que a enzima faz, o custo financeiro do suporte, os tipos de reagentes que são empregados durante o processo e a efetividade da enzima.

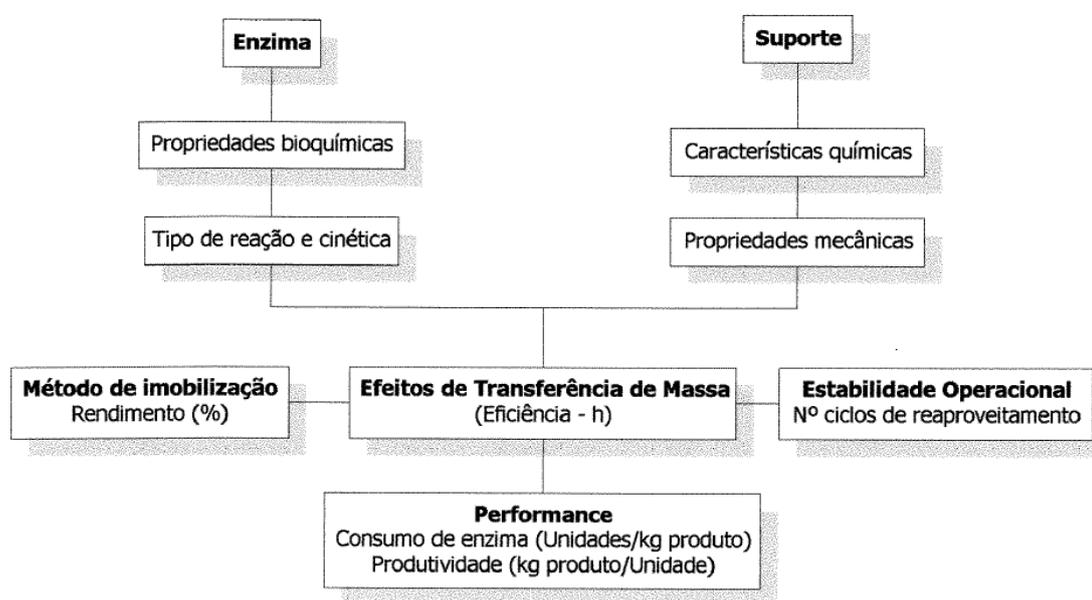
Os métodos mais utilizados são os confinamentos em microcápsulas ou matrizes poliméricas, imobilização por trocas iônicas em um suporte insolúvel (resinas) e por ligações covalentes em suportes poliméricos naturais (Dalla – Vecchia, 2004).



**Figura 13** – Métodos de imobilização de enzimas (Moreira, 2003).

Com o crescente desenvolvimento do setor biotecnológico, vários estudos estão sendo realizados, afim de promover novas técnicas de imobilização, com o objetivo de aprimorar os seguintes recursos: as propriedades da enzima, sua estabilidade em solventes e orgânicos e sua eficácia no rendimento da atividade, a reutilização do biocatalisador e a separação do meio reacional (Nascimento et. al. 2004; Santos, 2009).

No fluxograma a seguir, estão representados fatores que devem ser levado em conta, no processo de imobilização de enzima.



**Figura 14** – Fatores primordiais a serem considerados em imobilização de enzimas (Grigolon, 2001).

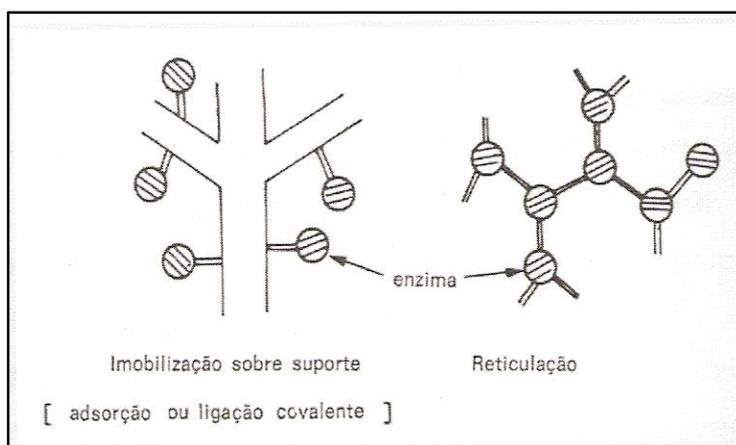
Os suportes mais utilizados, são os de origem polimérica, pois esses proporcionam uma maior estabilidade há enzima, dando assim, uma maior mobilidade molecular, expondo seu sitio ativo ao meio reacional, proporcionando um alto rendimento na atividade (Grigolon, 2001).

Para ajudar na escolha do suporte, algumas características são atribuídas para ajudar no processo de imobilização, as mais importantes e a disponibilidade da área superficial, a morfologia e composição, resistência mecânica e sua hidroflicidade (Dalla- Vecchia et. at., 2004).

Com tantas características a serem levadas em conta, tanto para a escolha do método e para o suporte, não é possível determinar com exatidão um suporte universal, que valha para todo tipo de enzimas.

#### 2.4.1.1 – LIGAÇÃO COVALENTE

Santos 2009, relata em seu trabalho, que a imobilização por ligação covalente, geralmente é o método mais comum, sendo utilizado um suporte insolúvel. A interação enzima/suporte, acontece na superfície do suporte, formando ligações covalentes com os grupos não ativos da enzima, com os grupos funcionais do suporte (hidroxila, carbonila ou amino) (Figura 15).



**Figura 15** – Imobilização de enzimas sobre suporte (Santos, 2009)

A maioria dos suportes insolúveis, utilizados na imobilização pelo método da ligação covalente, são polímeros que têm origem natural, sendo eles: celulose, quitosana, quitina, amino, agar-agar.

Estabilidade do suporte, molhabilidade, capacidade de imobilização, são fatores importantes para obter uma melhor interação (enzima/suporte) na realização do processo de imobilização. O exemplo, mais utilizado de suporte que atende esses fatores, são os formulados pela celulose e seus derivados.

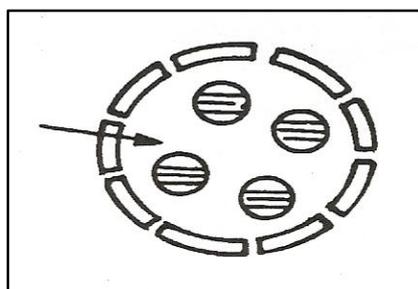
#### 2.4.1.2 – LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

A princípio este método é muito parecido ao anterior, entretanto, a diferença é que neste caso, há uma necessidade da ativação do suporte antes da imobilização. Esta ativação é proporcionada por um reagente bifuncional (epicloridrina, glutaraldeído). A interação acontece com a formação de ligações cruzadas, no qual parte do grupo funcional do reagente se liga ao suporte e a outra extremidade, se liga no grupo funcional (amino) da enzima (Comerlato, 1995).

O reagente mais utilizado, neste caso é o glutaraldeído, pois ele é capaz de proporcionar a enzima um ambiente bem similar, ao encontrado na natureza, conferindo uma melhor interação enzima/suporte, proporcionando também uma quantidade maior de enzimas imobilizadas (Santos, 2009).

#### 2.4.1.3 – MICROENCAPSULAMENTO

Neste procedimento, a enzima é aprisionada numa matriz polimérica ou encapsulada em capsulas poliméricas, ambos suportes sendo insolúveis. No caso das capsulas poliméricas, as enzimas são envolvidas no núcleo do suporte criando uma superfície porosa, que permite a passagem de pequenas moléculas, neste caso o substrato, que atravessa essa parede porosa e consegue chegar ao sítio ativo da enzima (Nascimento et. al., 2004; Santos, 2009).



**Figura 16** – Imobilização de um biocatalisador via microencapsulamento (Santos, 2009).

Mesmo havendo o contato da enzima com a parede interior da capsula polimérica, não acontece interação entre ambos, com isso, a enzima não sofre nenhum tipo de deformação na sua estrutura, mantendo intacta a sua atividade. Este procedimento demonstra ser muito eficaz, pois, o rendimento da atividade é bem promissor comparado aos demais métodos utilizado. Uma outra vantagem, é que o método de microencapsulamento é de fácil separação do biocatalizador do meio racional, pois a enzima não migra para o produto formado (Dalla-Vecchia, 2004; Neau, 2002; Santos, 2009).

#### 2.4.1.4 – ADSORÇÃO

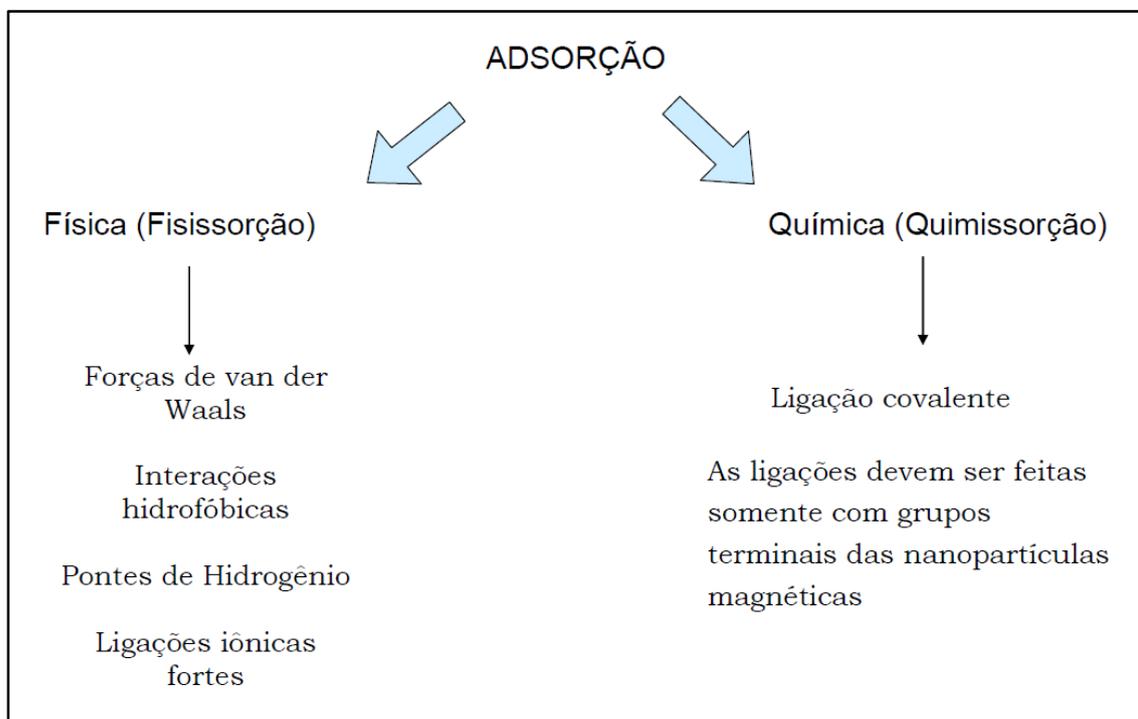
O método de adsorção é o mais utilizado na imobilização de enzimas. A ligação entre suporte e enzima, se dá pela formação de ligações de baixa intensidade. E na maior parte o suportes possui ainda nanopartículas magnéticas.

Para um melhor entendimento, o processo de adsorção pode ser dividido em dois tipos. O primeiro caso, conhecido como adsorção física, se dá pela interação de ligações do tipo: Van der Waals, pontes de hidrogênio, interações hidrofóbicas e ligações iônicas (Dalla-Vecchia, 2004).

Já o segundo caso, é conhecido como adsorção química, onde a interação enzima /suporte, acontece com a formação de ligações covalentes, onde a enzima é ligada diretamente ao suporte. Sendo igual ao processo por ligação covalente, pesquisadores denominaram este método de *crosslinking* (Santos, 2009; Rebelo, 2009).

Xu e seus colaboradores (2007) imobilizaram enzima por adsorção física, com intuito de melhorar a biocompatibilidade da superfície do suporte, beneficiando a atividade da enzima imobilizada através de um microambiente específico para enzimas. Neste trabalho, uma macromolécula natural, a quitosana, foi presa em uma superfície de poli (acrilonitrila- co- ácido maléico) (PANCMA) para preparar um suporte de camada dupla para a imobilização de enzimas.

O esquema abaixo representa resumidamente quais são os dois métodos utilizados para imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas (Figura 17).



**Figura 17** - Esquema resumido dos dois processos de adsorção (Rebelo,2009)

## 2.5 – QUITOSANA

A quitosana é um biopolímero natural utilizado em diversas áreas devido suas propriedades e características específicas. Além disso, seu uso está, geralmente, relacionado a vantagens ambientais, econômicas e sociais.

### 2.5.1 – OBTENÇÃO DA QUITOSANA

A quitosana é produzida através do processo de desacetilação da quitina, um outro polímero natural que ocupa a segunda colocação de ser o polímero mais abundante na natureza, sendo extraída de exoesqueletos de

crustáceos (camarões, lagostas e outros) (Prado, 2008). Com a presença dos grupos  $-NH_2$  (amina) e  $-OH$  (hidroxila) na cadeia polimérica da quitosana, favorece um poder enorme para a aplicação em diversas áreas (Santos, 2009).

Para obter a quitosana, é necessário submergir as carapaças dos crustáceos em uma solução ácida (HCl – 5%), onde acontecerá a reação de desminalização, que é a remoção do carbonato de cálcio ( $CaCO_3$ ). Após um determinado período, o material então é lavado por uma solução básica (NaOH), para a desproteínação e em seguida o material é posto para secagem.

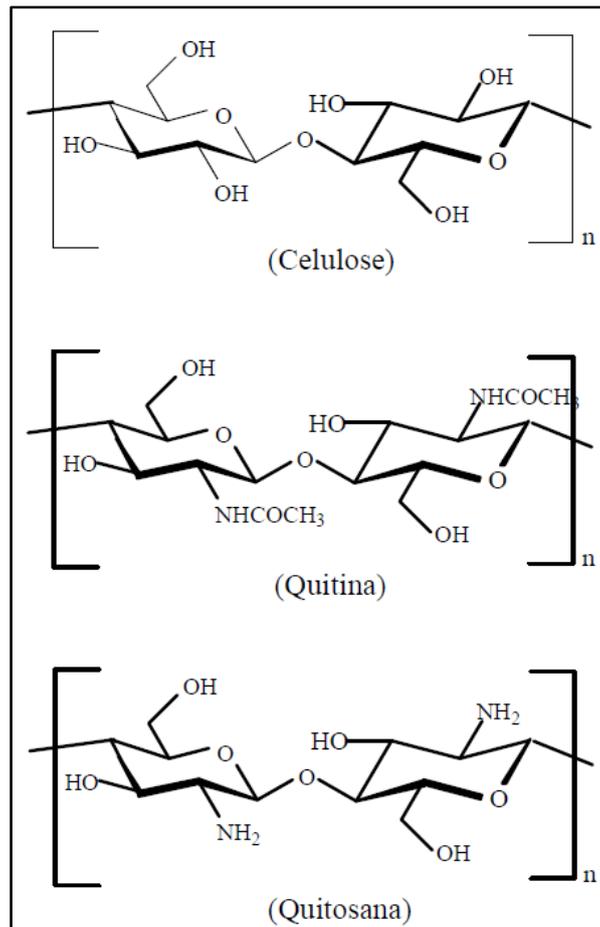
Depois da secagem a quitina está pronta para o processo de desacetilação, onde este material é adicionado em uma solução de 50% m/m de uma solução de hidróxido de sódio, afim de eliminar os grupos acetoamidos da quitina para surgir os grupos hidroxilas da quitosana. Depois do período de reação, o material então é lavado com água destilada e posto para secar.

## 2.5.2 – ESTRUTURA E ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITOSANA

Segundo Martins 2008, a quitosana e a quitina, têm sua estrutura semelhantes às da celulose. A diferença entre elas, estão nos seus grupos funcionais, sendo que:

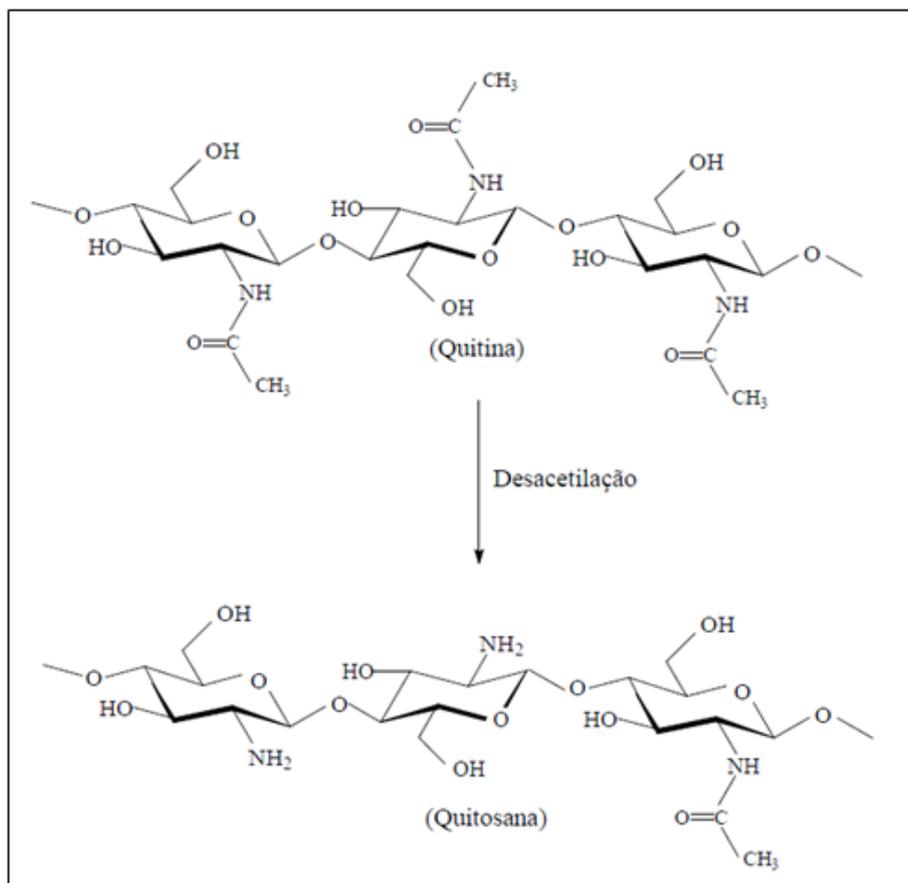
- Para a estrutura da celulose o grupo funcional  $-OH$ ;
- A quitina possui como grupo funcional o acetoamido ( $-NHCOCH_3$ ) no lugar do grupo  $-OH$  da celulose;
- Já na quitosana, o seu grupo funcional é uma amina ( $-NH_2$ ), que surge após o processo de desacetilação da quitina.

Essas características podem ser observadas na figura 18. Onde estão representadas as estruturas da celulose, quitina e quitosana.



**Figura 18** – Estrutura da celulose, quitina e quitosana(Martins, 2008).

No processo de desacetilação, o esquema da reação se dá pela quebra do grupo acetoamido, que é removido da quitina, que por sua vez é substituído por um grupo amino (NH<sub>2</sub>), isso tudo é proporcionado por um ambiente básico, normalmente uma base forte (NaOH) (Figura 19). Com tudo, a desacetilação pode vir a ser parcial, tendo ainda monômeros acetilados presente na estrutura da quitosana, provando que o polímero não é encontrado 100% puro. São essas unidades acetiladas, que podemos determinar o grau de desacetilação (GD), tal propriedade é determinante na hora de solubilizar o polímero em forma de solução.



**Figura 19** – Esquema da desacetilação da quitina

Em questão a sua solubilidade, quando a quitosana tem seus grupos aminos protonados, ela se torna um polímero solúvel e meio ácido, o mais utilizado neste caso é o ácido acético, que proporciona uma boa qualidade da solubilização, obtendo uma solução bem homogênea. Já em meio aquoso a quitosana se torna totalmente insolúvel (Santos, 2009).

Assim sendo, podemos afirmar que o grau de solubilidade da quitosana depende muito da quantidade dos grupos N – acetil e dos grupos amino presentes ao longo da sua cadeia polimérica.

Essas e outras características, torna a quitosana o polímero natural mais procurado e utilizado no processo de imobilização de enzimas como suporte, em relação aos demais polissacarídeos naturais, além disso, a quitosana tem um comportamento de um polímero básico, que lhe confere uma grande vantagem na hora da atividade (Prado, 2008).

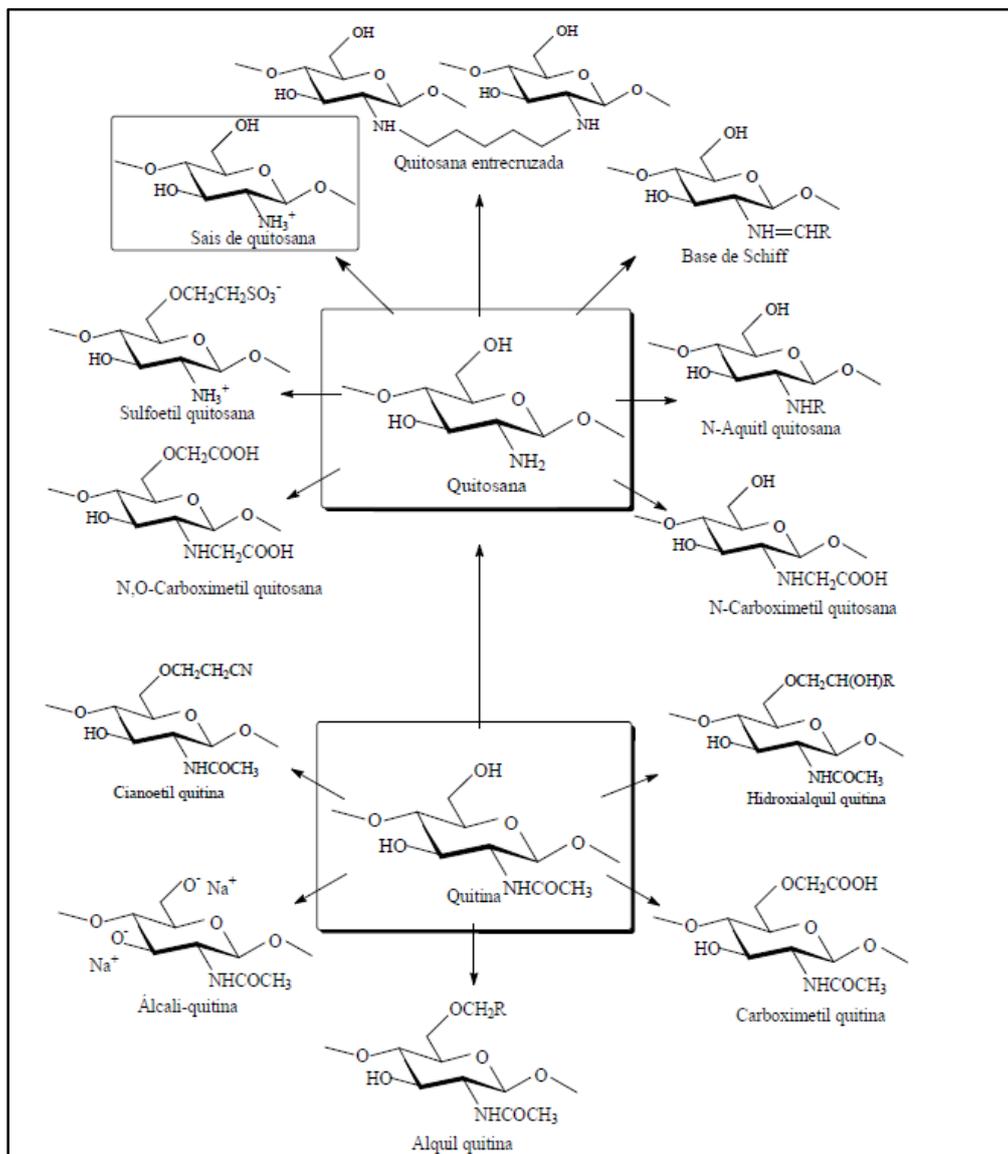
Mas não é apenas no setor biotecnológico e acadêmico que a quitosana tem despertado um grande interesse em outros setores. Este polímero vem mostrando ser um material com uma ampla aplicabilidade, tendo seus interesses voltados no tratamento de água, na medicina (liberação controlada de fármacos, cicatrização de ferimentos e até em suplementos alimentar), na elaboração de filmes para o revestimento de alimentos. Seu maior interesse comercial é na ação ante- obesidade, que atuam no organismo humo sobre complexos combatendo lipídeos presente no trato intestinal ou no retardamento da ação de lipídeos digestivos (Santos, 2009).

### 2.5.3 – MODIFICAÇÕES QUÍMICAS NA ESTRUTURA DA QUITOSANA

O interesse de se usar a quitosana como suporte, é que conseguimos adapta- lá em qualquer tipo de imobilização, realizando algumas modificações química na sua estrutura. Com essas modificações, e possível proporcionar uma maior estabilidade para a enzima. Como já foi dito a quitosana e de fácil obtenção, deixando o custo do suporte mais baixo, pois sua obtenção e proveniente de fontes renováveis. Por se tratar de um polímero natural sua toxicidade e muito baixa (Guibal, 2005; Martins, 2008).

As principais modificações ocorridas na estrutura da quitosana, estão relacionadas com os grupos amina ( $\text{NH}_2$ ) e hidroxila (OH), caracterizando assim uma ampla variedade de modificações (Figura 20).

Essas modificações dão ao polímero uma característica específica para cada produto obtido. Pesquisas atuais, relacionadas as modificações químicas da quitosana, apontam que seus sais, estão apresentando um forte desempenho na imobilização de enzimas, devido a quaternização dos átomos de nitrogênio do grupo amino (Martins, 2008).



**Figura 20** – Derivados de quitosana e quitina (Martins, 2008).

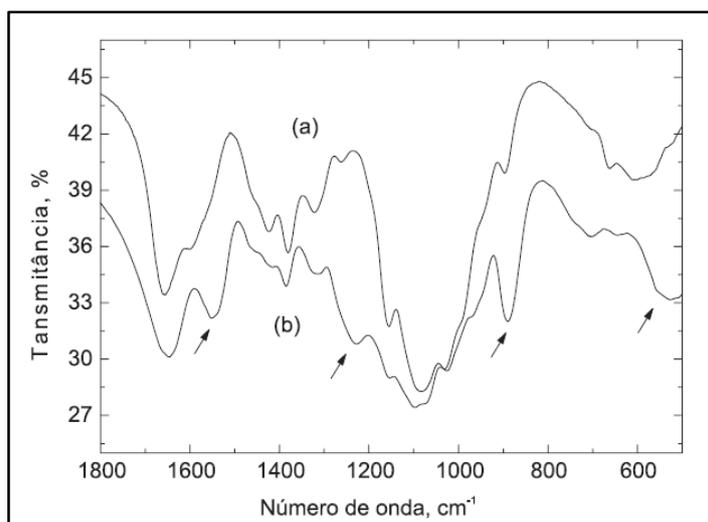
#### 2.5.4 – MÉTODOS DE MODIFICAÇÃO QUÍMICA NA ESTRUTURA DA QUITOSANA

Apesar de existir vários métodos para modificar quimicamente a estrutura da quitosana, todas essas modificações, têm como objetivo proporcionar o melhoramento da resistência mecânica do suporte, sua hidrofiliabilidade e a biocompatibilidade.

A modificação mais usada está relacionada na mudança da hidrofiliabilidade do suporte, tendo tanto o grupo amino ou o grupo hidroxila como opção de escolha. O intuito de modificar sua hidrofiliabilidade, e obter um polímero com baixa absorção de água. Essa modificação é ocasionada usando agentes bifuncionais, que podem ser adicionados diretamente na solução de quitosana (homogêneo), ou adicionado após a formulação do suporte (matrizes ou esferas) (heterogêneo). Os agente bifuncionais mais conhecidos são a epícloridrina, glutaraldeído, glicoxal e formaldeído, mas para a modificação do suporte que é utilizado na catalise enzimática os agentes mais indicados são a epícloridrina e o glutaraldeído, pois ambos estabelecem um rendimento maior no processo de imobilização (Martins, 2008; Santos, 2009).

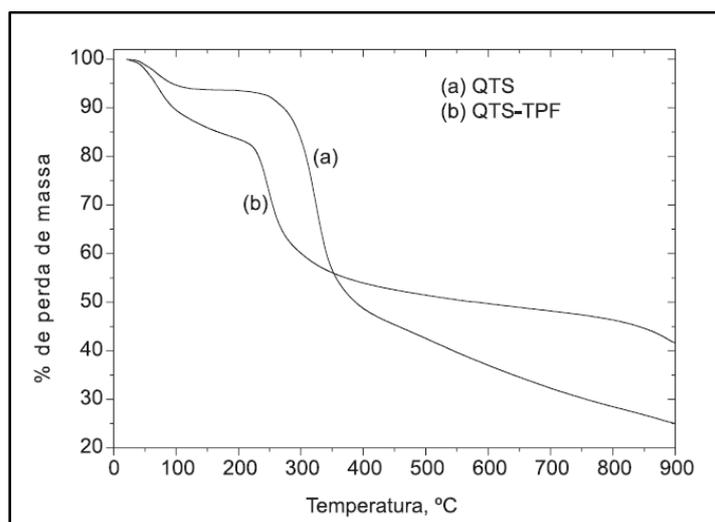
Laus et. al.(2006) utilizou microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato para remoção da acidez, de Ferro (III) e manganês (II) em água contaminada na mineração de carvão. Para caracterizar a QTS- TPF foram utilizadas técnicas de FTIR e TGA.

Com a análise de FTIR (Figura 21), foi demonstrado que no espectro (b) a uma interação do reagente tripolifosfato com os grupos amino protonados ( $\text{NH}^{3+}$ ) da quitosana, portanto, uma interação iônica pode ser evidenciada na região próxima a  $1552\text{ cm}^{-1}$ . As bandas em  $1228$  e  $889\text{ cm}^{-1}$  estão relacionadas às vibrações de estiramento do grupo  $\text{P}=\text{O}$  do grupo fosfato e em  $527\text{ cm}^{-1}$  aparecem às vibrações de deformação.



**Figura 21** - Espectro do infravermelho da QTS (a) e QTS-TPF (b) em pastilha de KBr (Laus, 2006).

As análises de TGA, realizadas com a QTS e a QTS-TPF, revelaram a perda de água e de massa (Figura 22). Nos termogramas, verifica-se que a temperatura de decomposição da QTS (a) foi de 325°C, correspondendo a uma perda de massa de 65,0%, enquanto o TGA da QTS - TPF (b) apresentou dois picos: o primeiro em 70,6°C, com uma perda de massa de 15,6%, em virtude da desidratação e o segundo pico em 247°C, correspondente à decomposição do QTS-TPF com 37,30% de perda de massa.



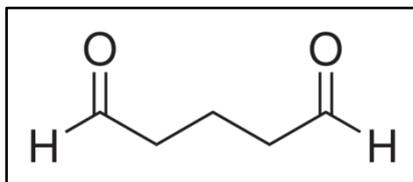
**Figura 22** - Termogramas de TGA da QTS (a) e QTS-TPF (b), sob atmosfera de nitrogênio (Laus, 2006).

Ao comparar as temperaturas de decomposição da QTS e da QTS-TPF constata-se uma diminuição da estabilidade térmica da QTS-TPF, atribuída à redução da cristalinidade da quitosana e introdução dos grupos fosfatos, confirmando a obtenção de um novo material.

#### 2.5.4.1 – MODIFICAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO

Com propriedades bifuncionais, o glutaraldeído (1,5 pentanedial), possui uma fórmula molecular  $C_5H_8O_2$  (Figura 23). O mecanismo de atuação sobre o polímero, acontece com a ativação dos grupos amino da quitosana, onde são formados ligações covalente. Este tipo de modificação é conhecida como

reticulação, sendo uma reação irreversível e faz também que a estabilidade térmica do polímero aumente.

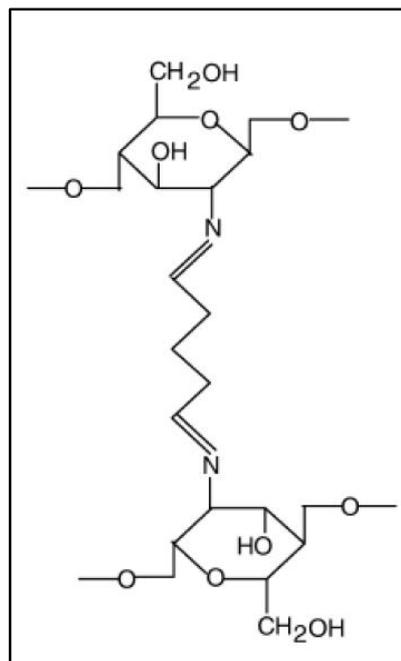


**Figura 23** – Estrutura do glutaraldeído(Sigma – Aldrich, 2012).

Apesar de ser uma modificação de fácil realização, seu mecanismo ainda é muito peculiar, onde estudos realizados, propõe hipóteses para explicar o que realmente acontece com a ligação do grupo funcional do reagente com o grupo funcional do polímero (Torres, 2006).

Para explicar este mecanismo, três hipóteses são propostas e citadas em vários trabalhos:

- Formação de uma *Base de Schiff*, sendo formada com a ligação entre o grupo aldeído do reagente com o grupo amino do polímero, sendo que o segundo grupo funcional do reagente permaneça livre (ligação superficial);
- A segunda hipótese se baseia também na formação da Base de Schiff, mas neste caso seria formado pela ligação de dois grupos funcionais do reagente com 2 moléculas de amino da quitosana (ligação entrecruzadas) (Figura 24);
- A Terceira hipótese, é que a modificação seria ocasionada pela polimerização, onde uma molécula do reagente reage com o grupo amino do polímero.

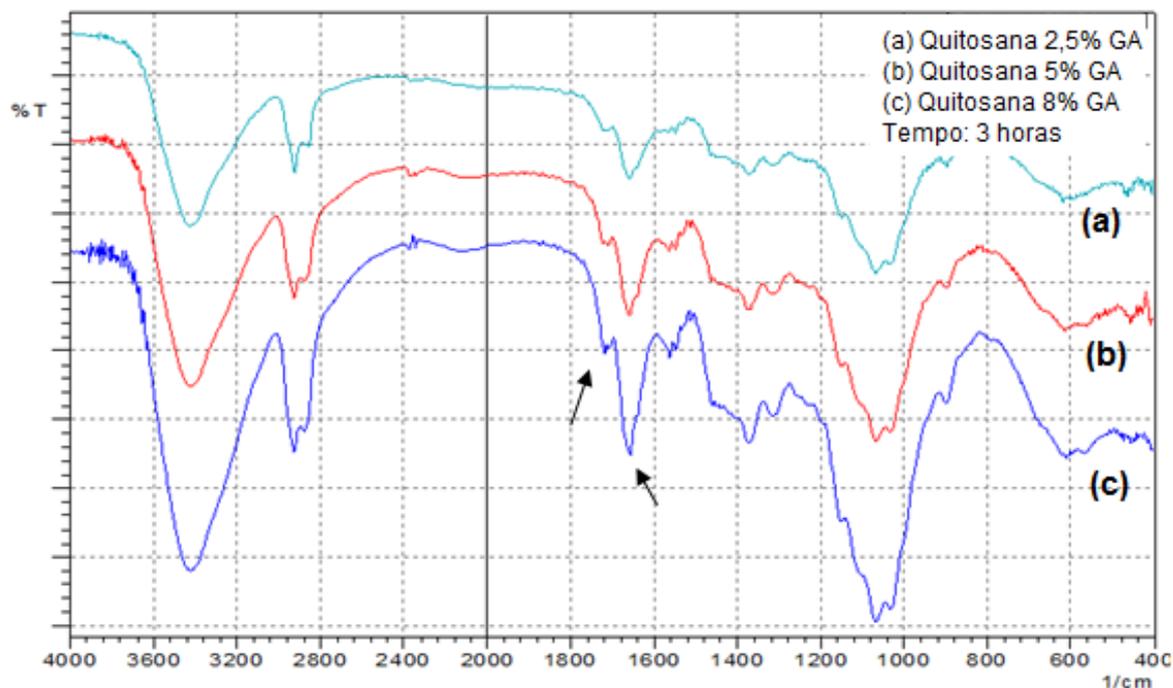


**Figura 24** – Estrutura química de quitosana reticulada com glutaraldeído(Mendes, 2009).

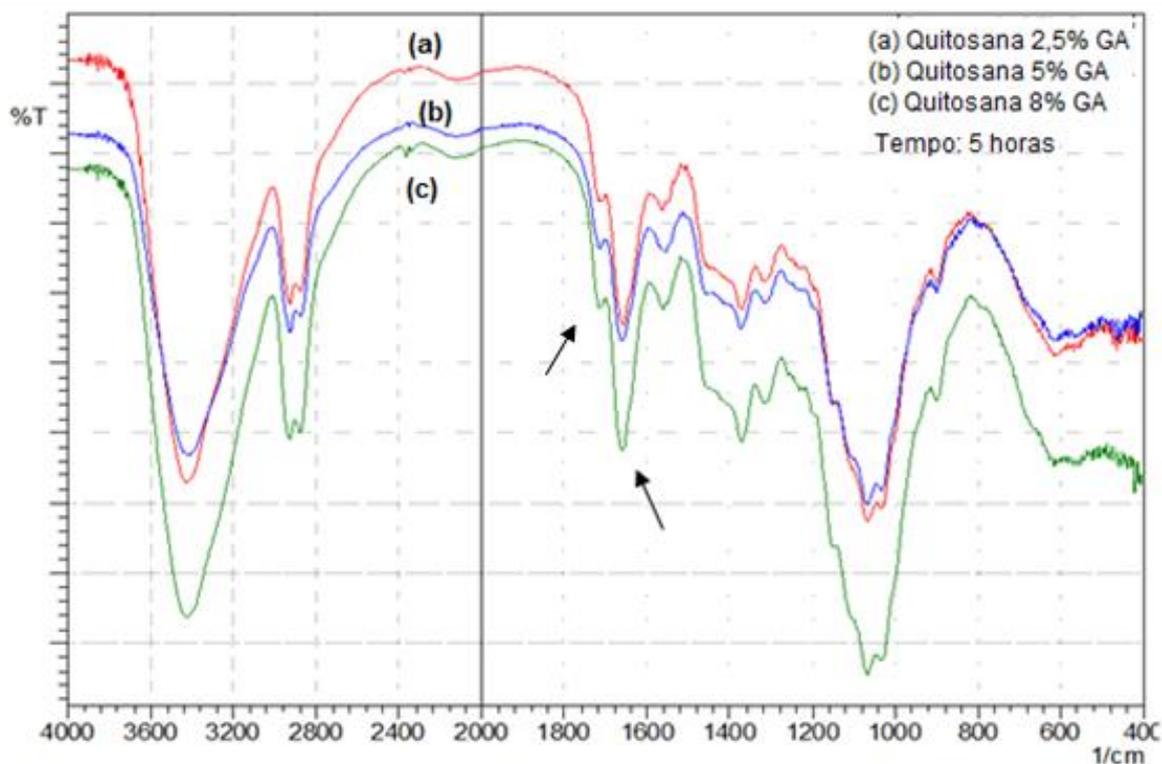
Carvalho, 2012 usa a técnica de infravermelho para analisar a modificação de partículas de quitosana-magnetita com glutaraldeído, com objetivo de examinar a característica das estruturas químicas dos três tipos de esferas ativadas com três concentrações diferentes: 2,5%, 5% e 8%, e com três diferentes tempos: 3, 5 e 6 horas. Para determinar a concentração adequada de glutaraldeído a ser utilizada na imobilização de enzimas.

Nas figuras 25, 26 e 27 pode se observa que a relação de intensidade entre o sinal da ligação C=N e NH<sub>2</sub>, teve um aumento a medida que a concentração de glutaraldeído aumenta e o tempo, este fato pode ser atribuído ao aumento das contribuições da molécula de GA na reação QUI-GA que promove o aumento na reticulação da cadeia.

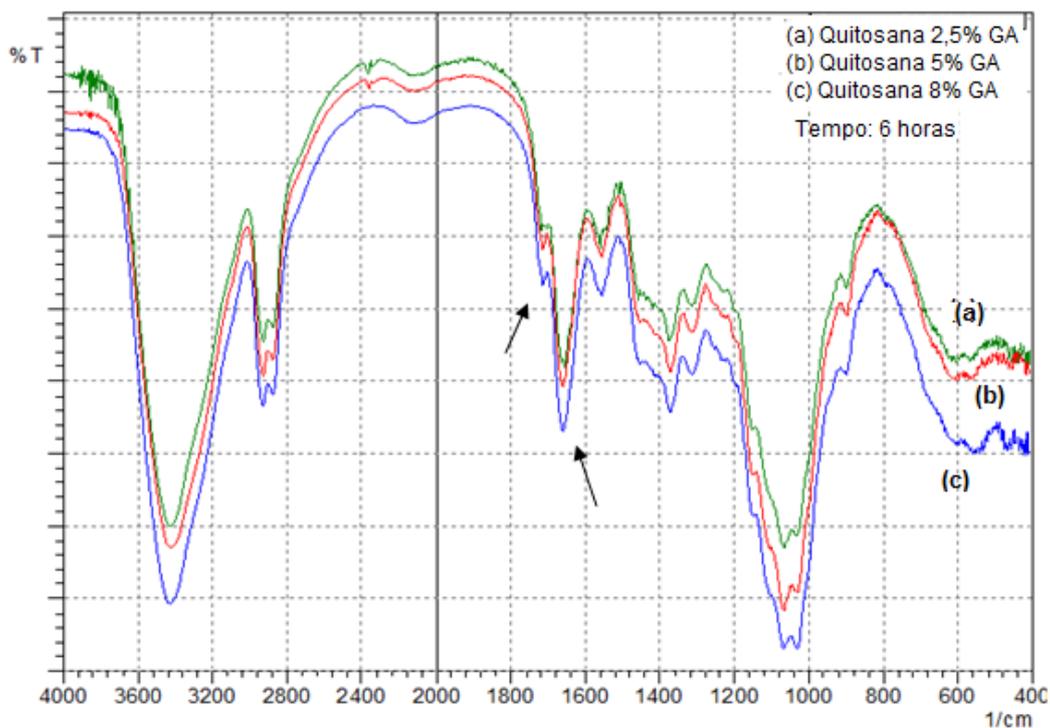
Já na figura 28, os espectros referente a utilização de uma solução de 8% de glutaraldeído (GA), foram plotados juntos, afim de se determinar o melhor tempo para a modificação. Pode -se observar que o sinal da banda C=N (1650 – 1750cm<sup>-1</sup>), teve uma melhor definição num tempo de 6 horas.



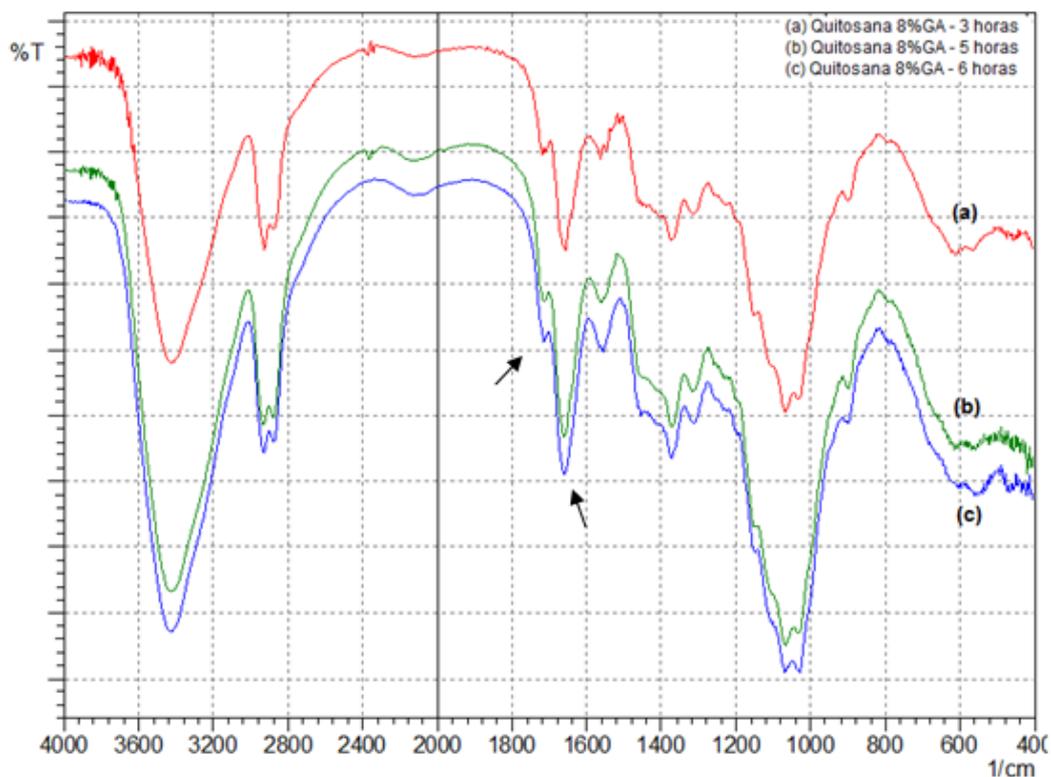
**Figura 25** - Espectros de infravermelho (FTIR) das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 3 horas (Carvalho, 2012).



**Figura 26** - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 5 horas (Carvalho, 2012).



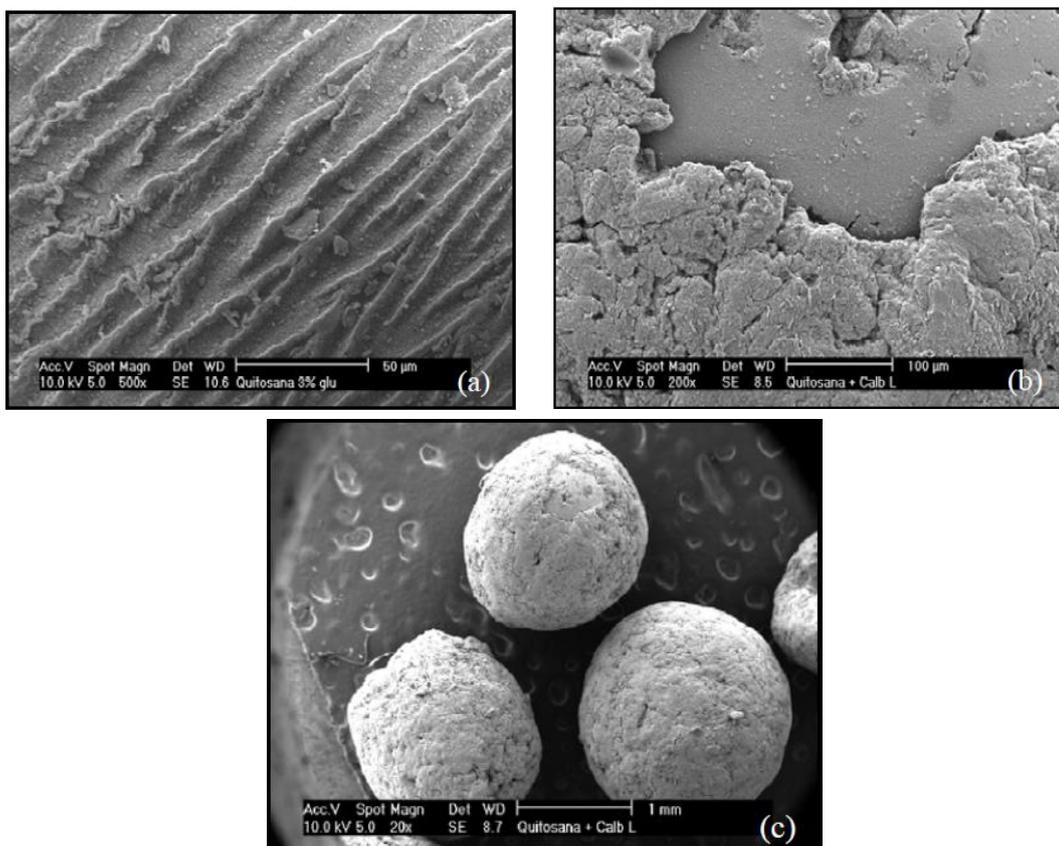
**Figura 27** - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 6 horas (Carvalho, 2012)



**Figura 28** - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com os melhores resultados da concentração de 8% GA com tempos 3, 5 e 6 horas (Carvalho, 2012).

Júnior, 2007 estudou a imobilização da lipase comercial (*Lipozyne CALB L*) em esferas de quitosana funcionalizadas com várias concentrações de glutaraldeído e avaliou a melhor concentração para posterior imobilização. Conclui que a concentração de 3% (v/v) foi a que proporcionou a enzima maior estabilidade e conferiu a mesma maior atividade residual.

Com micrografias eletrônica de varredura (MEV), pode perceber que houve uma aparente diminuição da porosidade na superfície do polímero. E observa-se também que a superfície das esferas de quitosana modificadas com 3% de glutaraldeído, houve um maior acumulo de enzimas imobilizadas.

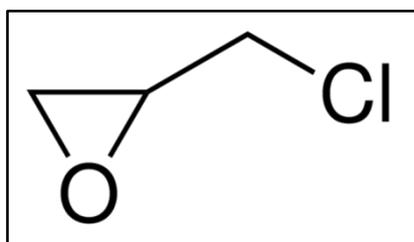


**Figura 29** - (a) Detalhe da superfície das esferas de quitosana com 3% glutaraldeído obtido através de MEV 100 Kv 5.0 20 X (b) Superfície das esferas de quitosana imobilizadas com lipase CALB L (c) Esferas de quitosana imobilizadas com CALB L com glutaraldeído 3% v/v (Júnior, 2007).

#### 2.5.4.2 – MODIFICAÇÃO COM EPICLORIDRINA

Outro reagente com propriedades bifuncionais é a epicloridrina (EPC). É um composto formado por organoclorado e um epóxido (Figura 30). É um reagente incolor, tendo um odor semelhante ao alho, possui uma fórmula molecular  $C_3H_5ClO$  e um peso molecular de  $92,53\text{g mol}^{-1}$ , tendo parcialmente solúvel em água.

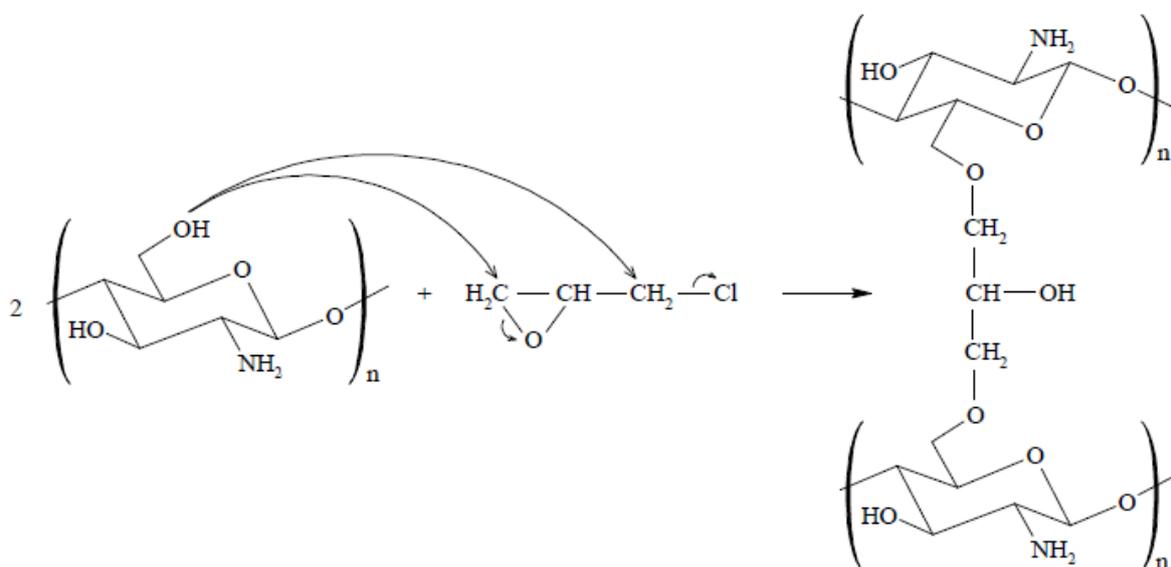
Por ser um composto muito reativo, a epicloridrina é utilizada em escala industrial apenas, na produção de glicerol, plásticos, adesivos e resinas epóxi.



**Figura 30** - Estrutura da epicloridrina (Sigma – Aldrich, 2012).

Seu mecanismo de atuação, se assemelha ao do glutaraldeído, mas neste caso, o grupo alvo da modificação são os grupos hidroxilas da quitosana. A reação acontece quando a quebra do anel epoxidico da epicloridrina, que resulta na saída do átomo de cloro, que em seguida, suas extremidades se ligam aos grupos hidroxila presente na cadeia polimérica da quitosana (Figura 31) (McMurry, 2008; Laus, 2011).

Essas reações podem ocorrer tanto com a apenas um grupo hidroxila da quitosana, deixando o grupo epoxidico da epicloridrina livre, ou ainda, pode acontecer entre duas moléculas do grupo hidroxila, com as duas extremidades do reagente (quebra do anel epoxidico). Neste caso, há uma formação de ligações entrecruzadas entre as cadeias da quitosana, formando assim, uma rede tridimensional, tornando o polímero mais rígido e insolúveis em meio ácido.



**Figura 31** - Estrutura química de quitosana modificada com epicloridrina (Laus, 2011).

A modificação química da quitosana, utilizando a epicloridrina é um processo heterogêneo, acontece somente quando o polímero se encontra na forma de membranas ou esferas, isso porque, a epicloridrina não é solúvel em soluções ácidas, pois para acontecer a ligação, entre seus grupos funcionais, a epicloridrina tem que ser submetida a um ambiente básico.

Huang e seus colaboradores (2007), utilizam o poli(acrilonitrilo-co- 2 metacrilato de hidroxietilo) (PANCHEMA) eletrofiado em membrana fibrosa como suporte para imobilização de enzimas, onde os grupos hidroxilos da membrana fibrosa foram ativados com epicloridrina, cloreto de cianúrico e p-benzoquinona. Constataram que a retenção da atividade para a lipase (*Candida rugosa*) imobilizada variou entre 32,5% a 40,6%, havendo uma melhora na sua estabilidade. Entre os processos de ativação do suporte, o que apresentou o melhor resultado foi o processo que usou a epicloridrina como ativador.

As atividades das lipases imobilizadas nas membranas fibrosas PANCHEMA através de diferentes métodos de ativação são comparados na Tabela 6. Constatou que a carga de enzima total era quase igual para a lipase

imobilizada preparado pelos três métodos, enquanto que a retenção da atividade da lipase imobilizada preparada pelo método I (40,6%) era ligeiramente maior do que a preparada pelo método II (36,4%) e pelo método III (32,5%). Em comparação como cloreto cianúrico e p-benzoquinona, a epícloridrina pode ligar covalentemente com os grupos amino disponíveis, hidroxilo ou sulfidrilo da enzima. A ligação aleatória com estes grupos da enzima pode reduzir a possibilidade da ligação covalente direta entre o centro ativo da enzima e a superfície do suporte. Além disso, ele pode formar um braço espaçador flexível entre a enzima e o suporte em comparação como cloreto cianúrico e p-benzoquinona.

**Tabela 6** – Imobilização de enzimas em PANHEMA) eletrofiado em membrana fibrosa (Huang, et. al, 2007)

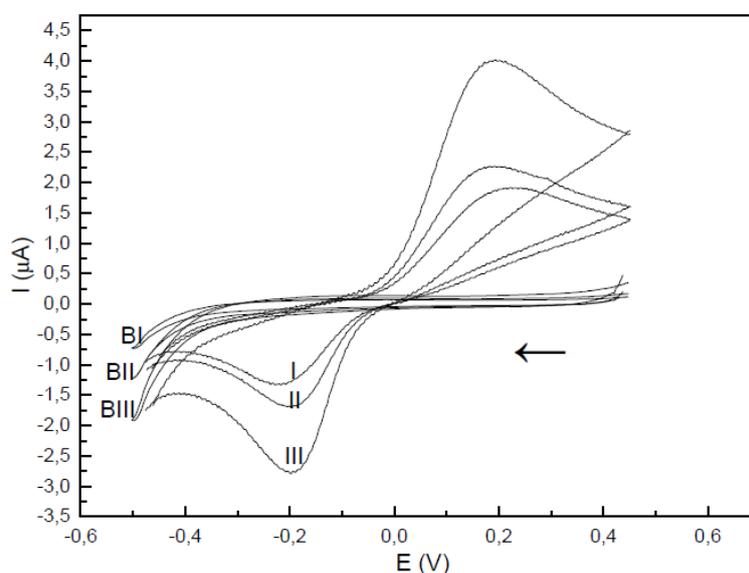
Método de ativação	Diâmetro da fibra (nm)	Carga de enzima (mg/g)	Atividade específica (U/mg) <sup>a</sup>	Retenção de atividade (%)
Epícloridrina	80 - 150	16,2 ± 1,1	17	40,6 ± 0,6
Cloreto de cianúrico	80 - 150	16,5 ± 1,3	15,3	36,4 ± 0,4
p-Benzoquinona	80 - 150	15,5 ± 1,2	12,1	32,5 ± 0,8

<sup>a</sup>Atividade específica para a lipase livre é de 42 U/mg

Oliveira (2006) estudou a peroxidase obtida do extrato de jiló imobilizada em quitosana previamente reticulada por três procedimentos: (I) reticulação dos grupos amino da quitosana com glutaraldeído; (II) grupos amino da quitosana reticulados com glutaraldeído e hidroxila ativado com carbodiimida; (III) grupos amino reticulados com glutaraldeído e hidroxila com epícloridrina. A quitosana reticulada pelos três procedimentos apresentou boa eficiência como suporte para imobilização da peroxidase obtida do vegetal jiló.

A Figura 32 mostra os voltamogramas cíclicos obtidos com os biossensores contendo extrato de jiló como fonte da enzima peroxidase,

imobilizada na matriz de quitosana, usando os três procedimentos: (I) grupos amino reticulados com glutaraldeído; (II) grupos amino reticulados com glutaraldeído e grupos hidroxila ativados com carbodiimida; (III) grupos amino reticulados com glutaraldeído e grupos hidroxila reticulados com epícloridrina em solução de hidroquinona  $3,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e peróxido de hidrogênio  $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ , em tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 7,0. Neste trabalho, as medidas de voltametria cíclica foram realizadas em uma faixa de potencial de + 0,45 a – 0,45 V vs eletrodo de Ag/AgCl ( $\text{KCl } 3,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) para uma velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ .



**Figura 32** – Voltamogramas cíclicos obtidos usando os biosensores propostos em solução tampão fosfato  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  (pH 7,0) e velocidade de varredura  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . Voltamogramas (BI, BII e BIII) obtidos em  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$  e (I, II e III) em solução de hidroquinona  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  e  $\text{H}_2\text{O}_2$   $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ . Velocidade de varredura de  $100 \text{ mV s}^{-1}$ . (Oliveira, 2006).

No biossensor (I) a enzima peroxidase foi imobilizada na quitosana reticulada com glutaraldeído, sendo que o menor sinal de corrente de pico catódico,  $I_{pc}$  foi observado nesse eletrodo. O melhor procedimento para a imobilização da peroxidase foi obtido usando a quitosana reticulada com glutaraldeído e epícloridrina, como mostra a Figura 32, voltamograma (III), que apresentou maior corrente de pico catódico. O melhor desempenho do biossensor (III) pode ser devido à formação mais efetiva da rede tridimensional

polimérica, tornando o suporte com maior porosidade, onde a enzima pode estar confinada (aprisionada, ocluída) entre os espaços das ligações covalentes formadas, e/ou ligada a um dos grupos aldeídos do glutaraldeído.

## CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 – MATERIAIS

- Quitosana fornecida por Sigma-Aldrich, Brasil, com grau de desacetilação em torno de 80 % e massa molar média igual a 161 g/mol.
- Cloreto Férrico III (ICO) Hexahidratado fornecido pela Vetec Química Fina Ltda.; Grau de Pureza: P.A.;
- Sulfato Ferroso II (OSO) Heptahidratado fornecido pela Vetec Química Fina Ltda.; Grau de Pureza: P.A.;
- Tetracloroetano fornecido pela Tedia Company; Usado como recebido.
- Ácido Acético e Ácido Clorídrico fornecidos pela Vetec Química Fina Ltda.; Grau de Pureza: P.A.; Usado como recebido.
- Ácido Oléico fornecido pela Synth; Grau de Pureza: P.A.; Usado como recebido.
- Hidróxido de Sódio (NaOH) fornecida pela VETEC, Grau de Pureza: P.A. Diluído em solução 1 M.
- Hidróxido de Amônia fornecido pela Vetec Química Fina; Grau de Pureza: P.A Concentração: 30% NH<sub>3</sub>; Usado como recebido.
- Álcool Etilico fornecido pela Cromoline Química Fina: Grau de Pureza: P.A. Usado como recebido.
- Tween 80 fornecido pela Vetec Química Fina Ltda.; Usado como recebido.
- Amano Lipase AK, from *Pseudomonas fluorescens*, fornecido pela Sigma-Aldrich.
- Spring Flip BR lípase purificada de *Fusarium oxysporum*, fornecida pela Granotec.
- Glutaraldeído 50% solução, fornecido pela Vetec, P.A.
- Epicloridrina com grau de pureza  $\geq 99\%$ , fornecido pela Sigma Aldrich – Brasil.

### 3.2 – PREPARAÇÃO DA SOLUÇÃO DE QUITOSANA

O polímero usado como suporte foi a quitosana da Sigma-Aldrich, Brasil, com grau de desacetilação em torno de 80 % e massa molar média igual a 161 g/mol.

O procedimento do preparo da solução de quitosana foi feita com 2 g de quitosana em pó solubilizada em uma solução de Ácido Acético (5%) sob agitação branda. Logo após a sua solubilização a solução de quitosana foi filtrada e armazenada.

### 3.3 – SÍNTESE DA NANOMAGNETITA (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)

A síntese foi realizada pela co-precipitação de sais de ferro II e ferro III em meio básico.

O procedimento foi realizado em um reator IKA-250 localizado no setor de polímeros LAMAV/CCT/UENF. O reator foi submetido a uma atmosfera de nitrogênio durante o período de 5 minutos (A) a uma temperatura de 82°C (B). Logo após este tempo foi adicionado os sais de ferro (FeCl<sub>3</sub>.7H<sub>2</sub>O 0,5M e FeSO<sub>4</sub>.6H<sub>2</sub>O 0,75M) na respectiva ordem juntamente com 220 mL de água deionizada (C) na relação molar 2:1, com agitação de 130rpm (D) e aguardar 15 min.

Logo o tempo decorrido, o nitrogênio é sessado para adição de hidróxido de amônia (8 mol/L) numa relação molar de 1:8 por 10min. A solução instantaneamente apresentara uma cor escura, com formação de precipitado. Após o tempo esperado religue o nitrogênio e aumente a temperatura para 90°C e aguarde cerca de 20min.

Ao término, a temperatura foi retomada para 82°C, para adicionar uma solução aquosa de ácido clorídrico (4%) até a correção do pH (pH≈8), em seguida, com o pH corrigido, foi adicionado 1,9mL de surfactante (Tween) aguardando mais 5min. Por último, adicionar ao sistema, 83mL de ácido oleico lentamente por 20min (E) (Figura 33).

O precipitado foi separado através de decantação magnética e em seguida lavado com etanol 3 vezes. As magnetitas obtidas foram armazenadas em álcool etílico e posteriormente colocadas na geladeira.



**Figura 33** – Reator IKA-250 localizado no setor de polímeros LAMAV

### 3.3.1 – CARACTERIZAÇÃO DAS NANOMAGNÉTITAS ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )

As micrografias de varredura foram realizadas num microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu, modelo SSX-550, disponível no LAMAV/CCT/UENF, sendo as imagens geradas a partir de elétrons secundários e elétrons retro espalhados.

As nanomagnéticas foram depositadas num porta-amostra com fita dupla face adesiva de grafite e recobertas com ouro formando um filme de 20 nm para não sofrerem descargas durante a análise.

Esta análise na morfologia externa das nanomagnética sintetizada foi realizada com finalidade de se observar a agregação das mesmas e tamanho das partículas.

### 3.4 – FORMULAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA COM NÚCLEO MAGNÉTICO

O método adotado para a formulação das microesferas é conhecido como coagulação. Onde uma solução ácida de quitosana é gotejada em uma solução básica bastante forte, normalmente tendo o hidróxido de sódio, a base mais utilizada. Ao entrar em contato com a solução coagulante (NaOH), a gota da solução de quitosana começa a se solidificar em forma de esferas.

A uniformidade e a geometria regular, são obtidas a partir do controle de alguns ajustes, tais como: a altura da queda da gota, em relação a superfície do coagulante, a velocidade do fluxo e da agitação mecânica e saída do gás inerte.

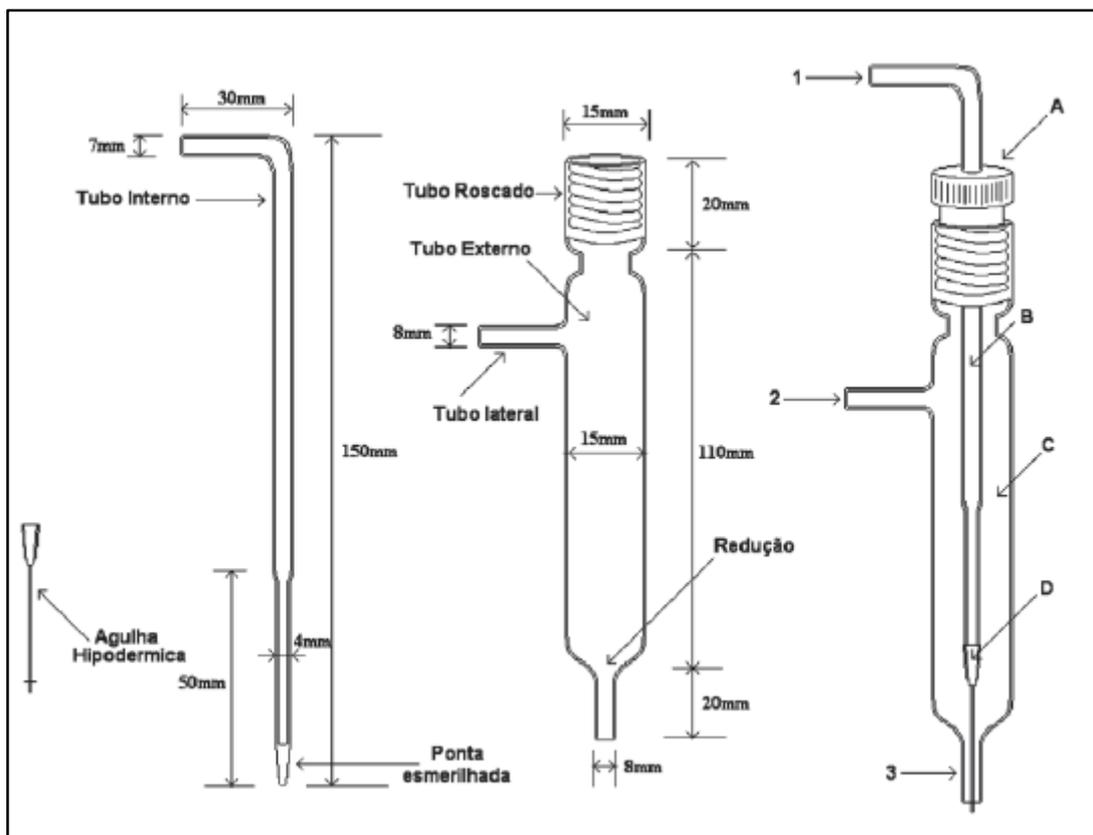
Em muitos casos quando a solução de quitosana, apresenta uma densidade menor do que a solução coagulante, ao entrar em contato com a mesma, a geometria da gota irá sofrer deformações, apresentando então uma geometria oval e não esférica (Dias et.al. 2008).

O gotejador foi construído a partir de adaptações de um esquema apresentado por Rorrer et. al.; 1993, Dias et. al.; 2008. Neste caso foram confeccionados dois tubos de vidros, sendo um posto dentro do outro, e introduzido uma agulha hipodérmica comercial.

Na figura 34, mostra exatamente como os tubos de vidros são posicionados e suas respectivas medidas para a sua confecção.

O primeiro passo, então é confeccionar um tubo de vidro externo, tendo uma saída lateral, para ser a entrada do ar comprimido. O segundo passo é na obtenção do segundo tubo de vidro interno, que será colocado no interior do tubo maior, este tudo deve ter no mínimo 180mm de comprimento, onde sua ponta deverá ser esmerilada, proporcionando uma maior fixação da agulha.

Para uma melhor eficiência o tubo interno deve permanecer centralizado em relação ao tubo externo, para isso foi necessário, a colocação de uma tampa rosqueável. Além disso, a posição da agulha poderá ultrapassar apenas 3mm da boca do vidro externo.



**Figura 34** - Esquema do gotejador. (A) Adaptador de polietileno; (B) tubo de vidro interno, (C) tubo de vidro externo, (D) agulha hipodérmica. 1- Entrada da solução; 2- entrada de ar; 3- saída de ar (Dias, 2008).

A solução de quitosana, é levada até a agulha com o auxílio de uma bomba peristáltica, mantendo sempre um controle bem estável em relação a sua velocidade. Um outro controle sensível, e a saída do ar comprimido ( $N_2$ ), sendo fornecido por um cilindro, que é ligado a um rotômetro, para garantir um melhor controle.

O primeiro passo para a formulação dessas microcápsulas foi pegar a solução de quitosana dissolvida em solução de ácido acético (5%*m/v*) posteriormente filtrada, e logo após dispersar a magnetita nessa solução (A). A solução assim obtida foi gotejada através de uma agulha (B) sobre uma solução de hidróxido de sódio ( $NaOH - 3mol$ ) (D) com o auxílio de uma bomba peristáltica (C) sob atmosfera de um gás inerte, neste caso o nitrogênio ( $N_2$ ) (Figura 35).



**Figura 35** – Esquema formulado para a técnica de coagulação

### 3.5 - MODIFICAÇÃO QUÍMICA DAS MICROESFERAS COM NÚCLEO MAGNÉTICO

A quitosana foi modificada com epiclorigrina (1-cloro-2,3-epoxipropano) tendo como o intuito de modificar quimicamente a estrutura da quitosana, com o propósito de aumentar a resistência das microcápsulas e ampliar a capacidade do suporte na imobilização de enzima. O mecanismo de modificação, nesse caso, envolve o bloqueio preferencial dos grupos hidroxila presente na cadeia polimérica da quitosana, permitindo que os grupos amino permaneçam livres (Hudson et al., 1992).

O método utilizado para realizar essa modificação consiste no preparo da seguinte solução: dissolver 0,4 mL de epiclorigrina em 417 mL de NaOH (solução de NaOH a 0,067M). Logo após foi adicionado a essa solução 25g de microcápsulas úmidas. Essa solução foi colocada em banho maria com uma temperatura a 40°C por 2 horas e sob agitação branda.

Ao término desse tempo as microcápsulas foram separadas e lavadas 3 vezes com água destilada e posteriormente secas em dessecador.

### 3.6 - ATIVAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS COM GLUTARALDEIDO

Já o mecanismo de ativação com glutaraldeído irá reagir com os grupos  $\text{NH}_2$  da quitosana formando uma rede polimérica, na qual a enzima lípase será imobilizada.

Os suportes foram embebidos em solução de glutaraldeído 8% (v/v) e em solução tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7, sendo mantido sob agitação por 6 horas com temperatura de 30°C, com velocidade de 160rpm. Após esse período, lavou-se o suporte 3 vezes com solução tampão fosfato pH7 e água destilada e, o qual foi, depois, levado à estufa (50°C) por 18 horas.

### 3.7 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE PARTIDA E MODIFICADA

As microesferas com núcleo magnético de partida e as modificadas foram caracterizadas com o auxílio das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Análise Termogravimétrica (TGA) e Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC).

#### 3.7.1 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A absorção de radiação pelas moléculas de uma substância causa transições nos estados rotacionais e vibracionais dos átomos ou grupos atômicos. Essas vibrações fornecem informações a respeito das ligações químicas dos constituintes atômicos, isto porque cada ligação absorve um comprimento de onda específico para alterar seus estados roto-vibracionais.

Através desta radiação absorvida é possível identificar as ligações presentes, grupos químicos entre outras características estruturais particulares do polímero (Carvalho, 2008).

A análise de FTIR foi realizada com o objetivo de examinar a característica tanto das estruturas química do filmes e para as duas formulações de microesferas (QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>), para acompanhar a presença dos agrupamentos alvo das modificações.

Os espectros na região de infravermelho foram analisados na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, com 50 varreduras em um equipamento de infravermelho com transformada de Fourier que se encontra no prédio dos Laboratórios de Materiais Avançados no setor de polímeros (LAMAV/SEPOL). Os espectros de FTIR foram obtidos usando pastilhas de brometo de potássio (KBr) para as microesferas.

Para formular as pastilhas, microesferas de quitosana com núcleo magnético e o KBr foram macerados em um almofariz e logo em seguida esta mistura foi passada por uma peneira. Posteriormente foi feita a pastilha que foi prensada em uma prensa hidráulica para posterior análise no espectrofotômetro.

A caracterização das microcápsulas por espectroscopia de infravermelho, como já dito, é uma técnica amplamente difundida e citada por vários autores (Pescara, 2008).

### 3.7.2 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica amplamente usada para o estudo da estrutura molecular dos compostos. Baseia-se na alteração do número quântico spin em função de um campo magnético externo. A excitação do núcleo, ou a sua oscilação de uma orientação para outra, é detectada como uma voltagem induzida, resultando da absorção de energia do campo de radiofrequência.

A ressonância magnética nuclear (RMN) de Baixo Campo é um método poderoso para obter informação sobre a mobilidade molecular utilizando medições de relaxação obtidas a partir do tempo de relaxamento da análise do

próton de spin-rede ( $T^1H$ ). Esta técnica é usada para avaliar a miscibilidade, homogeneidade e compatibilidade de mistura de polímero ao nível molecular. É bem conhecido que as propriedades do polímero estão dependentes tanto da estrutura molecular (por ordem molecular e dinâmica molecular) e a organização das cadeias no estado sólido. A  $T_{um}$  parâmetro relaxamento H é medida usando uma sequência de pulsos de recuperação de inversão tradicional (reciclagem atraso -  $180^\circ$  -  $\tau$  -  $90^\circ$  - aquisição) (Silva, 2009).

Relaxação spin-estrutura é muito sensível, não só para as rotações/reorientações moleculares locais, mas também a auto-translacional de difusão das moléculas porque o  $^1H$  da relaxação spin-estrutura depende das interações dipolares que podem ocorrer entre rotações inter ou intramoleculares (Monteiro, 2013).

A resposta a esse comportamento pode ser extraído por técnicas de RMN de estado sólido, tais como: fiação de ângulo mágico (MAS), o tempo de contato variável, de recuperação de inversão, spin-bloqueio, tempo de contato atraso e cross polarização (MAS).

A utilização da análise de ressonância magnética nuclear de baixo campo tem como propósito contribuir para verificação de domínios de tempo de relaxação da cadeia polimérica da quitosana de partida e da quitosana modificada, considerando as medidas de relaxação dos prótons de spin-rede ( $T^1H$ ).

As análise de RMN de baixo campo foram feitas no equipamento Maran Ultra (Oxford Instruments), operando num campo magnético de 23,4MHz localizado no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro – IMA/UFRJ.

Para o ensaio de relaxação longitudinal (Inversão – recuperação) teve uma sequência de pulso:  $180^\circ$  -  $\tau$  -  $90^\circ$ , operando num intervalo de tau:0,1 a 5000 milissegundos, tendo 1 segundo de tempo de espera entre cada medida de tau em uma temperatura de  $28^\circ C$ . Já para relaxação transversal (solid-Echo) teve uma sequência de pulso:  $90^\circ$  -  $\tau$  -  $90^\circ$ , valor de tau utilizado: 5 microssegundos ( $\mu s$ ), tendo 1 segundo de tempo de espera entre cada medida de tau em uma temperatura de  $28^\circ C$ .

### 3.7.3 – DETERMINAÇÃO DA CARGA MAGNÉTICA E ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO DAS MICROESFERAS

Os métodos de análise térmica medem variações de um determinado parâmetro ocorridas como uma função da temperatura,  $T$ , (aquecimento ou resfriamento) ou como uma função do tempo,  $t$ , a uma temperatura constante (modo isotérmico) (Lucas, 2001).

Os resultados dessas análises são mostrados sob a forma de um gráfico cuja abscissa contém os registros de temperatura (ou do tempo) e a ordenada, o percentual em massa perdida ou ganha (Cavalheiro *et al.*, 1995; Lucas, 2001; Carvalho, 2008).

#### 3.7.3.1 – TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada com auxílio do sistema SDT 2960T da TA Instruments com sensibilidade na termobalança de  $0,1\mu\text{g}$ , na faixa de temperatura de  $25\text{-}900^\circ\text{C}$  com uma taxa de aquecimento de  $10^\circ\text{C}/\text{min}$  e uma atmosfera dinâmica ( $50\text{ mL}/\text{min}$ ) de nitrogênio.

#### 3.7.3.2 - CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC).

Está análise foi realizada num DSC-2010 da TA Instruments com taxa de aquecimento de  $20\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ , na faixa de  $25\text{-}400^\circ\text{C}$  utilizando um fluxo de nitrogênio de  $20\text{ mL}/\text{min}$ . Massa de  $13\text{ mg}$  de amostras foram colocadas em panelas herméticas de alumínio.

Tal análise foi realizada para determinar tanto a carga de magnetita como a degradação térmica da quitosana modificada utilizando um sistema de análise termogravimétrica, SDT 2960-TA Instruments, disponível na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial de Materiais LAMAV/CCT/UENF, com sensibilidade na termobalança de  $0,1\mu\text{g}$ , na faixa de temperatura de  $20\text{-}900^\circ\text{C}$

com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e uma atmosfera inerte, 100 mL/min de nitrogênio.

#### 3.7.4 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias de varredura foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura (MEV), operando com aceleração de voltagem de 15 keV, realizado no Laboratório de Materiais Avançados LAMAV/UENF. As micropartículas foram depositadas em porta-amostra com fita adesiva de grafite e metalizadas.

O objetivo da análise teve como intuito determinar a morfologia das microesferas de partida e das modificados analisando o seu tamanho e a sua superfície.

#### 3.7.5 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS

A análise granulométrica de partículas sólidas compreende a determinação do tamanho das mesmas, bem como da frequência com que ocorrem em uma determinada classe ou faixa de tamanho. (Lima *et. al.*, 2001; Carvalho, 2012).

A distribuição de tamanho e dimensão das micropartículas magnéticas foi determinada a partir de micrografias ópticas. O tamanho médio das micropartículas nas micrografias (4 micrografias, cada um contendo aproximadamente 25-50 microesferas) foi avaliado quanto ao tamanho e distribuição de tamanho.

#### 3.7.6 – PROPRIEDADES MAGNETICAS

Está técnica permite a obtenção de informações fundamentais dos materiais ferromagnéticos através da aquisição do ciclo de histerese dos

mesmos. De tais curvas é possível extrair informações do campo coercivo, a magnetização de saturação e a magnetização da amostra.

As propriedades magnéticas foram estudadas utilizando um magnetômetro Physical Property Measurement System (PPMS) da Quantum Design, as medidas foram feitas pela opção Vibrating Sample Magnetometer (VSM) em temperatura ambiente 305K aplicando um campo externo de +/- 2 tesla, que foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

### 3.8 – PREPARAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA

A solução de quitosana foi preparada pela dissolução de 2g de quitosana em pó para cada 100 ml de uma solução de ácido acético glacial com concentração de 5% sob agitação magnética a 40°C sob banho maria até a sua completa homogeneização.

Em seguida, a solução polimérica foi filtrada a vácuo para remover o material insolúvel. O filtrado foi vertido em placas de petri com diâmetros de 90 mm e acondicionado em estufa a 40°C até a evaporação do ácido e formação da membrana. Após a secagem das membranas, as mesmas foram retiradas da placa petri e imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 3M, sob agitação de 150rpm aguardando um período de 1 hora, a fim de assegurar a completa neutralização das membranas.

Após o tempo decorrido as mesmas foram lavadas com água corrente para retirada da solução de hidróxido de sódio e posteriormente submersos em um recipiente com água destilada durante 1h 30min, tempo suficiente para que ocorresse a neutralização. Depois da neutralização, as mesmas foram secas em temperatura ambiente com pesos em cima para não deformar o filme.

#### 3.8.1 – MODIFICAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA

O primeiro passo para a modificação dos filmes de quitosana, foi a pesagem do filmes ainda molhados. Os filmes obtidos teve em média uma

massa de 1,37g, onde foi submerso em uma solução contendo 0,02mL de epicloridrina com 23ml de uma solução de hidróxido de sódio (0,067M).

O sistema foi posto sob agitação de 110 rpm em um shke, em uma temperatura de 40°C, por 2 horas.

### 3.8.2 – CARACTERIZAÇÃO SUPERFICIAL COM AUXILIO DA MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

No estudo da morfologia superficial de materiais poliméricos a técnica de MFA, utilizada de forma complementar a outras técnicas, apresenta vantagens, em relação a microscopia eletrônica de varredura que a torna particularmente valiosa. Com o uso da MFA não é necessário o uso de vácuo e recobrimento da amostra, as medidas realizadas permitem determinar os relevés e rugosidade até escalas atômicas (Herrmann, et. al.,1997; Filho et. al., 2003; Miyakawa et. al., 2008).

As imagens foram obtidas em um MFA *Multi Mode Nanoscope III Scanning Probe Microscopy Veeco Instruments*, localizado no Setor de Polímeros do Laboratório de Materiais Avançados/UENF, operando em atmosfera ambiente e temperatura entorno a  $21\pm 2^\circ\text{C}$ , usando o modo contato intermitente. As imagens obtidas tiveram como objetivo o estudo topográfico da superfície das membranas de quitosana (QTS) e quitosana modificada (QTS/EPC) e determinação da rugosidade superficial o que complementa o estudo realizado Por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com o propósito de aprofundar no impacto da modificação sobre a superfície dos filmes.

Os filmes foram cortados em quadrados e presos em um porta amostra de metal, onde foram geradas imagens, numa frequência de varredura de 1,5 Hz. Quantitativamente as variações na morfologia das amostras foram expressas a partir da média das alturas obtida em uma determinada área (z), o desvio padrão das diferentes alturas ( $R_q$ ) e a rugosidade média ( $R_a$ ). As medidas de rugosidade foram feitas com auxílio do programa de do sistema MFA, *NanoScope (R) III*, fornecido pela *Veeco Instruments*. A área da

superfície dos filmes avaliados foi de  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$ , sem tratamento prévio da imagem. Através da equação abaixo, foi possível determinar o desvio padrão ( $R_q$ ), dos valores encontrados (Stamatialis et. al., 1999; Dias, 2003; Santos 2001).

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum(Z_i - Z_m)^2}{N_p}} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde  $z_i$  é a altura no ponto  $i$ ,  $N_p$  o número de pontos,  $z_m$  é a média das alturas

### 3.8.3 - ANALISE DO IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QTS COM EPICLORIDRINA SOBRE O COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE A VAPORES DE ÁGUA

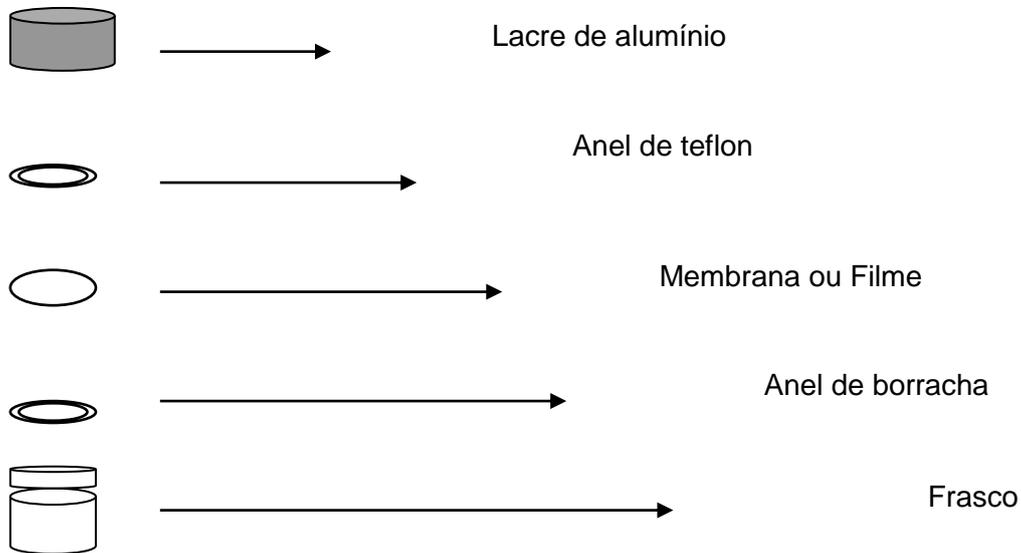
A determinação dos coeficientes de permeabilidade, depende de fatores tais como: estrutura da fase permeada (polímero), morfologia (influência da presença de zonas cristalinas com efeito barreira) e natureza e tamanho da molécula do permeante entre outras (Dias, 2003; Matta Junior, 2009).

A permeabilidade, do material pode ser expressa como a massa de permeante que atravessa uma interfase (filme ou membrana polimérica) na unidade de tempo para uma espessura, área e uma diferença de pressão entre as superfícies da interfase (filme ou membrana) podendo ser expressa na unidade de medida, Barrer:  $10^{-10} [\text{cm}^3 (\text{STP}) \text{ cm cm}^{-2} \text{ s cm Hg}^{-1}]$  (Alter, 1962).

As medidas de permeabilidade de vapor de água para os filmes de QTS e os filmes modificados de QTS/EPC foi determinada com o auxílio de uma termobalança marca *Halogen Moisture Analyzer* modelo *HR73* da *Mettler Toledo*, localizado no Setor de Polímeros/LAMAV/UENF.

Para as medidas se utilizou um recipiente de vidro (tipo copo de Payne) (Figura 36) no qual foi adicionada aproximadamente 0,868g de água destilada

(vapor permeante), e posteriormente colocado o filme polimérico no copo e lacrado.



**Figura 36** - Sistema tipo "copo de Payne" utilizado para medidas de permeabilidade

O copo é colocado na balança termogravimétrica a temperatura e 50°C e umidade relativa externa constante (40%) registrando-se a perda de massa devida ao vapor da água permeada cada 2 minutos.

A permeabilidade foi calculada a partir da taxa de perda de massa de vapor da água (Galego et. al. 2002), utilizando a equação 2.

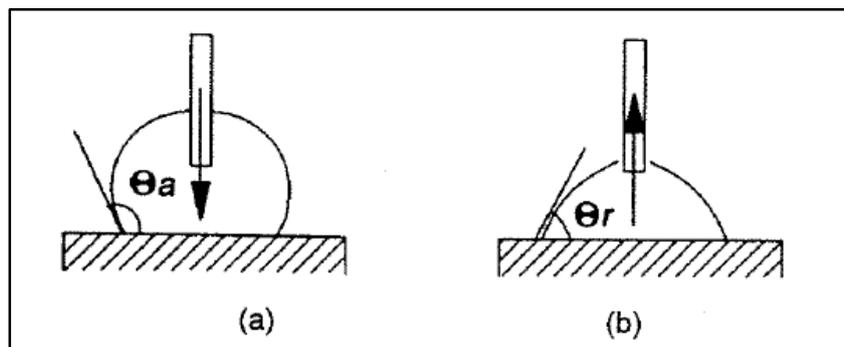
$$P = \frac{(Quantidade\ de\ permeante) \times (espessura\ do\ filme)}{(Area) \times (Tempo) \times (Queda\ da\ pressão\ através\ do\ filme)} \quad Eq\ 2$$

### 3.8.4 – ÂNGULO DE CONTATO

O método direto mais simples e utilizado para obter medidas de um ângulo de contato é a partir da medição do perfil da gota de um determinado líquido ou de uma bolha depositada sobre uma superfície sólida.

No método da gota séssil, uma gota de um líquido devidamente purificado é depositada sobre a superfície de um sólido por meio de uma micro seringa. A gota é observada com uma lente de baixo aumento, e o ângulo de contato é medido através de um goniômetro.

Este tipo de procedimento é geralmente chamado de medida estática do ângulo de contato e é um dos métodos mais usados na medida de um ângulo de contato. Esta técnica nos permite medir, tais como, os ângulos de avanço ( $\theta_a$ ) e os de retrocesso ( $\theta_r$ ), aumentando ou diminuindo, respectivamente, o volume da gota sobre uma superfície, como mostra a Figura 37.



**Figura 37** - Método da gota séssil: medida dos ângulos de (a) avanço e (b) retrocesso. (Sellin, 2002).

O valor do ângulo de contato da gota depende da energia de superfície da amostra e da tensão superficial do líquido. Se a gota se esparramar por toda superfície do material seu ângulo de contato será de aproximadamente zero, mas se o espalhamento for parcial o ângulo de contato sofrera uma variação em seus valores, sendo em torno de 0 a 180 graus.

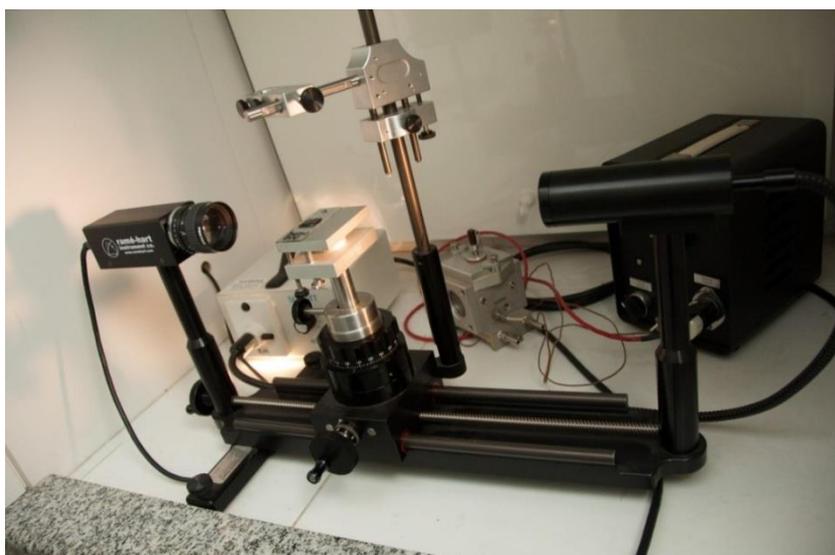
Para a escolha do líquido deve levar em conta as seguintes propriedades: baixa volatilidade, baixa viscosidade, ser estável e não atacar ou

reagir com a superfície do substrato. O líquido selecionado determina o grau de molhabilidade e da interação com a superfície do substrato, diz-se que um líquido quando molha um substrato o ângulo de contato formado entre o líquido e o sólido é menor que  $90^\circ$ .

Geralmente um suporte hidrofílico é o melhor para a imobilização de enzimas, pois tal suporte não só maximiza a área disponível para fixação da enzima como também melhora a eficiência da imobilização e a camada água essencial que rodeia o biocatalisador e previne a diminuição da atividade catalítica (Carvalho, 2012).

O objetivo desta análise foi observar as alterações das características dos materiais obtidos quanto ao seu caráter hidrofílico, onde foram avaliadas por medidas de ângulo de contato.

A análise dos filmes de QTS e QTS/EPC foi realizada no Laboratório de Superfícies Poliméricas e Asfálticos do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. As medidas de ângulo de contato foram obtidas empregando-se o goniômetro Ramé-Hart, modelo NRL (Figura 38), operado em temperatura ambiente. Os ângulos de contato do lado direito e esquerdo da gota foram calculados automaticamente por meio de *software* RHI 2001 Imaging Software instalado em um computador acoplado ao equipamento.



**Figura 38** – Goniômetro Ramé-Hart utilizado para medição dos ângulos

### 3.9 – IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES POR LIGAÇÃO COVALENTE

Após o período de ativação com glutaraldeído, o suporte foi imobilizado por ligação covalente de acordo com a metodologia adaptada por Castro et. al., 1999; Castro et. al., 2010 e Pereira et.al., 2010. O suporte foi ativado em hexano na proporção de 1:10 e mantido sob agitação a 100rpm durante 2 horas e levado a estufa a 40°C até secar.

Para cada grama de suporte ativado (matéria seca), foram adicionados 0,5mg de lipase na forma livre. PEG-1500 foi adicionado com a solução de enzima (85mL de tampão fosfato de sódio pH7) em um valor de 5mg/mL de suporte, para a fixação da lipase ao suporte efetuou-se em agitação durante 4 horas, em temperatura de 25°C, e seguido por período adicional de 16 horas em condições estáticas a 4°C. Os suportes imobilizados foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato.

Após o processo de imobilização a atividade das partículas e as massas enzimáticas e lavadas foram mensuradas segundo a metodologia descrita para determinação da atividade enzimática, com o objetivo de se conhecer a concentração da lipase AK e da Flip BR imobilizadas nas esferas de quitosana e das esferas de quitosana modificadas.

### 3.9 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLITICA

A atividade enzimática da enzima livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise de azeite de oliva de acordo com a metodologia adaptada de Li et. al., 2010 e Carvalho 2012. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 $\mu$ mol de ácido graxo por minuto de reação.

O preparo da emulsão foi feito pelo seguinte modo: 25mL de azeite de oliva e 75mL de goma arábica a 3% m/m. Em frascos de 125mL foi adicionados: 5mL da emulsão e 2mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH7,0. A fim de garantir homogeneização do meio reacional, o sistema então foi mantido sob agitação (160rpm) a 40°C por 5 minutos. Logo após esse processo foi

adicionado os respectivos suportes imobilizados, a solução enzimática, a solução da enzima livre e a solução lavada sendo feito duplicatas para cada suporte, esse sistema também ficou sob ação de uma agitação (160rpm) durante o tempo de 5 minutos.

Após esse período de incubação, a reação então foi paralisada pela adição de 10mL de uma solução de etanol e acetona (1:1).

Em seguida cada solução foi agitada com um ultra-turrax com velocidade de 8000 rpm e centrifugada por 10 minutos com velocidade de 4000 rpm. Então foi retirada de cada solução uma quantidade de 10 mL para titulação direta.

A solução foi titulada utilizando 2 gotas de indicador fenolftaleína, com o auxílio de um agitador magnético, no pipetador para titulação foi adicionado uma solução de NaOH 0,1M. O volume gasto foi anotado para a realização dos cálculos, conforme a Equação 3.

$$A(U/g) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3}{t \times m} \quad (\text{Equação 3})$$

Onde:

- M = concentração molar da solução de NaOH;
- m = massa da enzima;
- t = tempo de reação em minutos;
- V<sub>a</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);
- V<sub>b</sub> = volume de NaOH gasto na titulação do controle (mL).

## **CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES**

### **4.1 – CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA NÃO MODIFICADA (QTS) E MODIFICADA (QTS/EPC)**

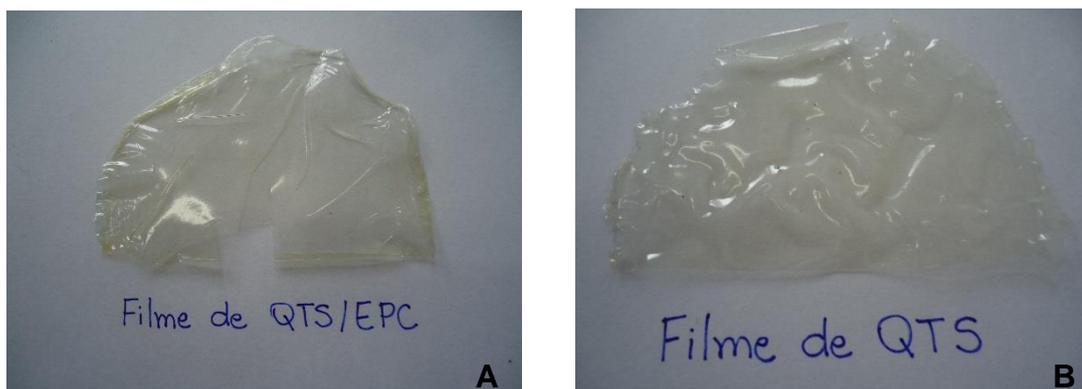
A partir da desacetilação da quitina, foi possível obter a quitosana, que por sua vez, foi submetida ao processo de modificação, utilizando um agente bifuncional a epicloridrina. O objetivo dessa modificação foi verificar a mudança da hidrofiliabilidade da quitosana. Com o auxílio das técnicas de MEV, FTIR e Ângulo de Contato, foi possível, então, caracterizar a morfologia da QTS e QTS/EPC.

#### **4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QTS E QTS/EPC**

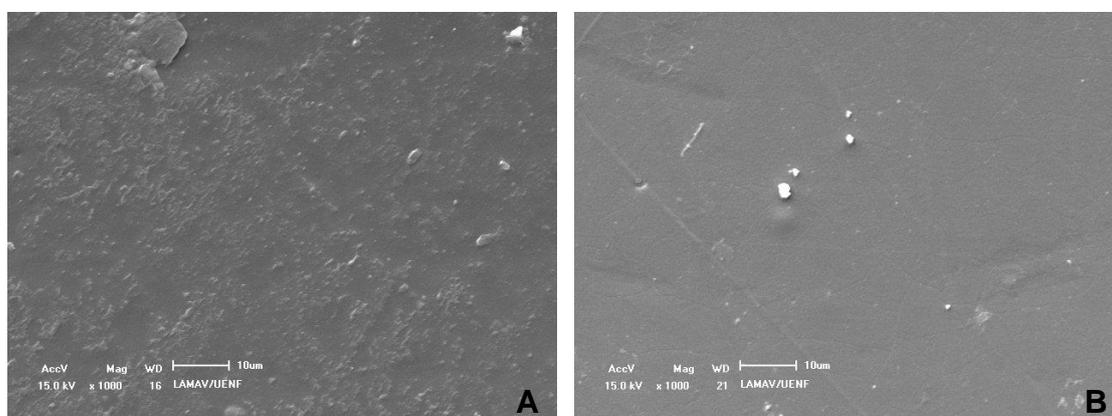
Macroscopicamente não se observa mudanças nos filmes de QTS e QTS/EPC (Figura 39). Ambos os filmes são transparentes e possuem uma coloração amarelada. A única característica aparente e que após a modificação, o filme de QTS/EPC é mais rígido e quebradiço que o filme de QTS não modificado.

Com as micrografias eletrônicas dos filmes (Figura 40) podemos observar que a morfologia dos filmes densos de QTS apresentaram uma superfície rugosa. Já para os filmes densos de QTS/EPC observa-se, aparentemente uma superfície mais lisa, característica típica de filmes mais densos (Dallan, 2005; Nascimento et. al, 2012).

Levando em conta, que para ambos os filmes, apresentaram uma transparência após sua obtenção e modificação, a única diferença foi que para o filme denso de QTS/EPC, após a modificação apresentou-se aparentemente bastante quebradiço.



**Figura 39** – Filmes de quitosa; (A) filme de quitosana modificado, (B) filme de quitosa não modificado



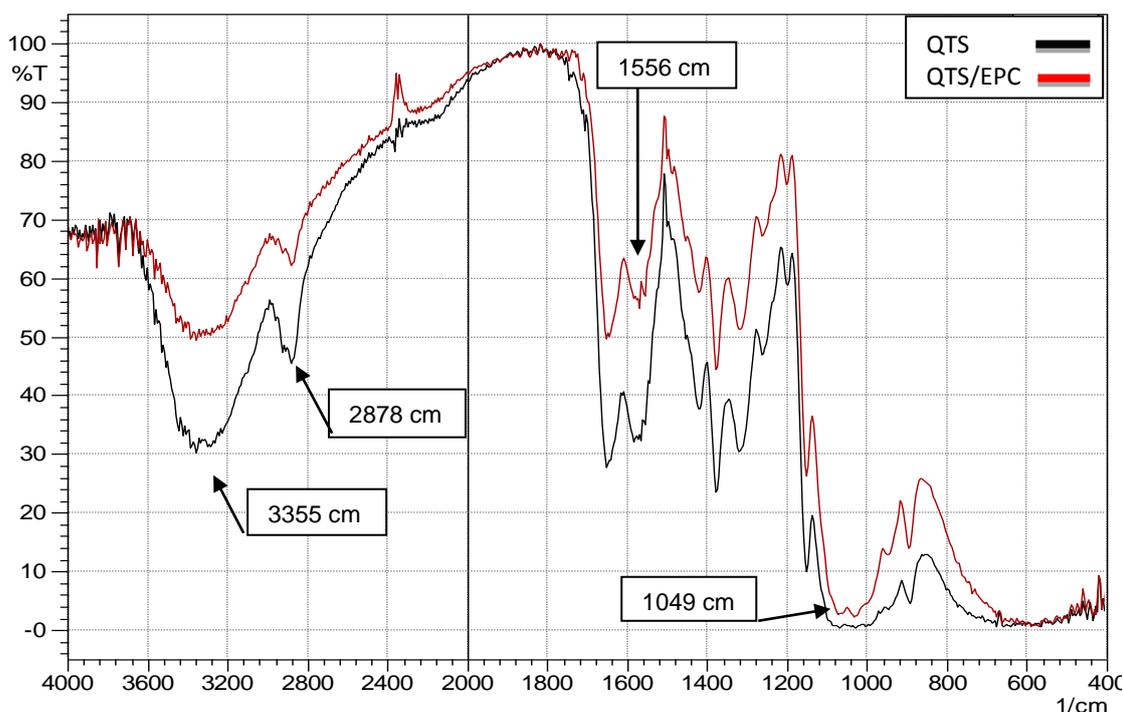
**Figura 40** – Micrografias eletrônicas de varredura dos filmes de; (A) QTS pura e (B) QTS/EPC.

#### 4.1.2 - ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO DOS FILMES DE QTS E QTS/EPC

A caracterização dos filmes de QTS e QTS/EPC, pela análise de FTIR, teve como objetivo, identificar os principais grupos funcionais presentes ao longo da cadeia da quitosana, e as possíveis modificações nestes grupos, sendo ocasionados com a introdução da epícloridrina.

Os espectros de FTIR dos filmes de QTS puro e QTS-EPC, estão representados na Figura 41 a seguir. Onde para a quitosana pura, são encontradas quatro bandas de absorção, sendo elas: a primeira e banda em

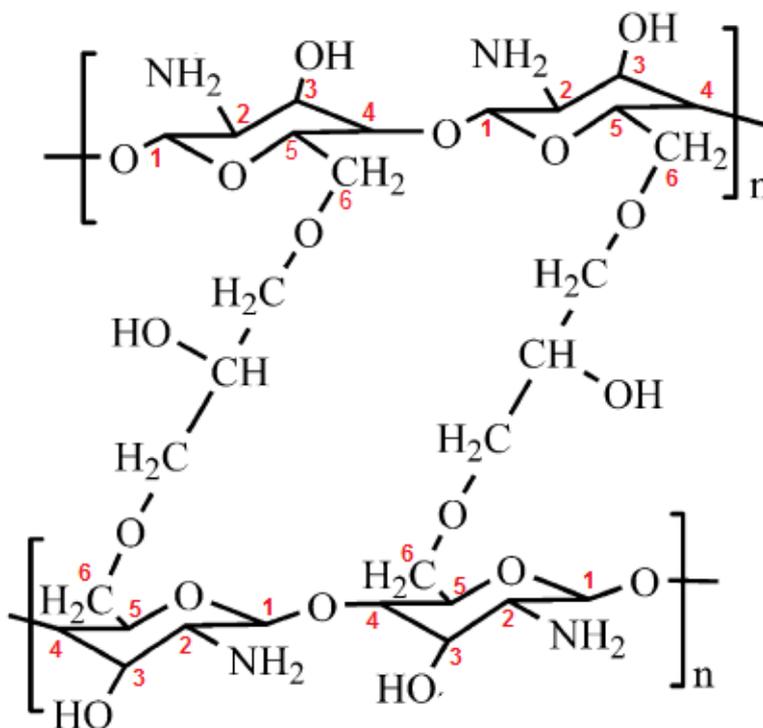
torno de  $3600\text{-}3200\text{ cm}^{-1}$  é caracterizada pelas ligações dos grupos hidroxila (-OH), o surgimento desta banda, se dá pela ligação hidrogênio intermolecular (Zivanovic et. al. 2007, Liu et. al. 2013), a segunda banda, menos intensa em  $2878\text{ cm}^{-1}$  é atribuída as vibrações do grupo alquilas com hibridações  $sp^3$  (Wan et. al. 2006, Zianovic et. al. 2007), a terceira banda aparece no espectro com uma grande intensidade e se localiza na região de  $1650\text{ cm}^{-1}$  devido as vibrações do grupo carbonila da amida (C=O), presente na quitosana comercial parcialmente desacetilada (80%GD). A última banda importante se localiza na região de  $1570\text{ cm}^{-1}$  são as vibrações atribuídas a absorção dos grupos amina  $\text{NH}_2$  (Duan et. al. 2004).



**Figura 41** – Espectros de IR dos filmes densos de QTS e QTS/EPC

Já os espectros para o filme de QTS-EPC, apresentam os mesmos grupos do filme de QTS, mas entretanto, duas bandas podem estar associada na formação da ligação covalente, entre a hidroxila da quitosana com o grupo funcional da epiclorigrina, a primeira banda localizada em  $1556\text{ cm}^{-1}$  a aparição de um pico, devido as vibrações de alongamento da ligação C-O-C; a segunda

banda, localizada na região de  $1049\text{ cm}^{-1}$  é atribuída, as vibrações do grupo hidroxila (-OH) presente no carbono C<sub>6</sub> (Figura 42)(Dong et. al. 2004).



**Figura 42** – Esquema representativo da ligação covalente entre a EPC e o C<sub>6</sub> da QTS.

#### 4.1.3 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DOS FILMES DE QTS E QTS/EPC POR AFM

As imagens foram registradas pelo método de contato intermitente evitando a danificação da superfície dos filmes eliminando as forças de cisalhamento. Estas imagens forneceram valores relacionados com a rugosidade da superfície, levando em conta a média das alturas, o desvio padrão e a rugosidade.

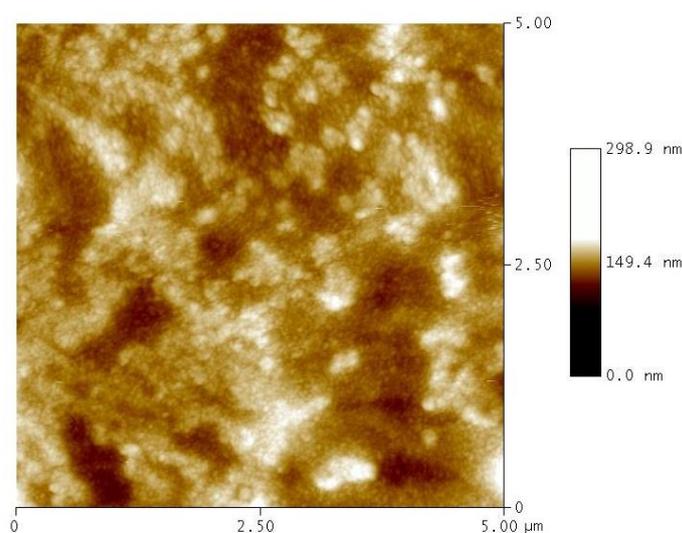
Os valores obtidos pela equação 1 são expressos na tabela a seguir:

**Tabela 7** – Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície do filmes de QTS e QTS/EPC.

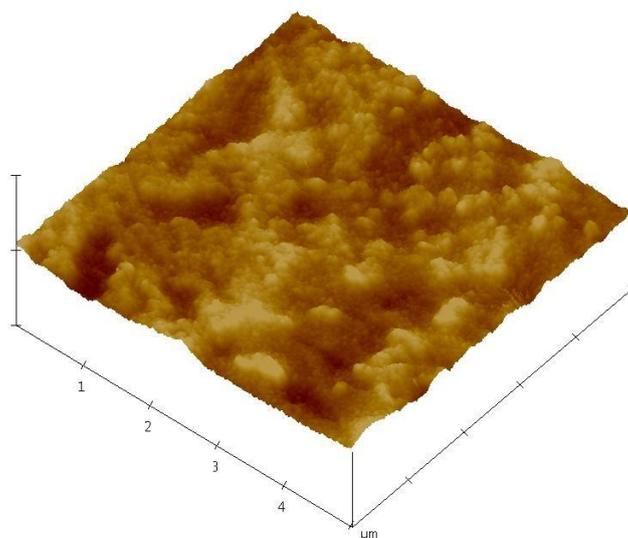
Filme	R <sub>a</sub> (nm)	R <sub>q</sub> (nm)	z(nm)
QTS	9,6	11,9	80,6
QTS/EPC	7,6	10,4	95

Neste caso, Z é a diferença entre o ponto mais alto e mais baixo para uma dada área; o desvio padrão do valor de z (R<sub>q</sub>) para a área superficial analisada; e a rugosidade média (R<sub>a</sub>) que representa o valor médio das alturas da superfície, relativas a um plano central que divide a mesma em duas porções de igual volume (Herrmann, et. al.,1997; Filho et. al., 2003).

Através das imagens de superfície do filme de QTS, obtidos por AFM (Figuras 43, 44), é possível perceber que o mesmo apresenta uma superfície com um nível de rugosidade relativamente regular (R<sub>a</sub> = 9,6nm), além disso, as imagens obtidas por AFM, mostra um sistema bastante homogêneo.

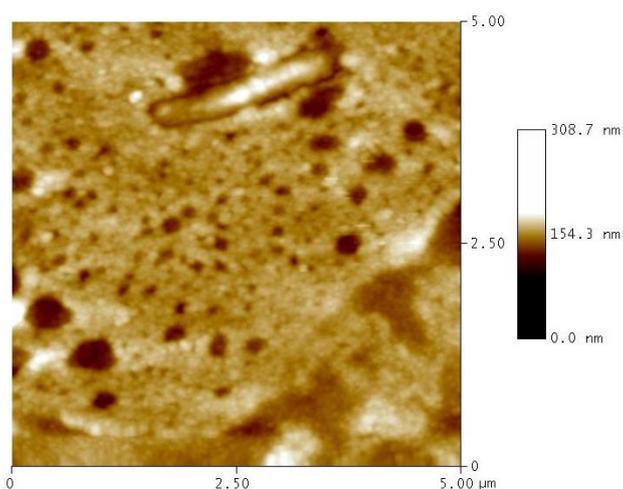


**Figura 43** - Microscopia de força atômica mostrando a morfologia da superfície do filme denso de QTS

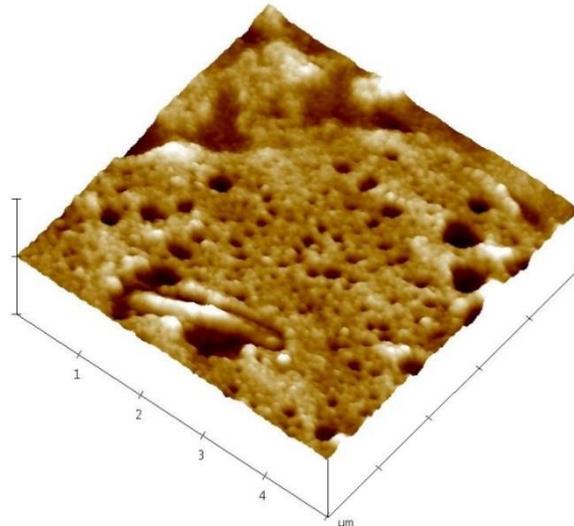


**Figura 44** - Microscopia de força atômica da topografia do filme denso de QTS com  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  de área.

As imagens de MFA dos filmes densos de QTS/EPC (Figuras 45, 46), apresentaram uma menor rugosidade em sua superfície ( $R_a = 7,6\text{nm}$ ), além disso, pode constatar a aparição de “poços” mais profundos em relação aos filmes densos de QTS preparados com uma metodologia similar o que é um indicativo da modificação originada na quitosana e que pode ser correlacionada com as propriedades de transporte do vapor da água (Pemeabilidade) registrada para estes filmes.



**Figura 45** - Microscopia de força atômica mostrando a morfologia da superfície do filme denso de QTS/EPC



**Figura 46** - Microscopia de força atômica da topografia do filme denso de QTS/EPC com  $5\mu\text{m} \times 5\mu\text{m}$  de área.

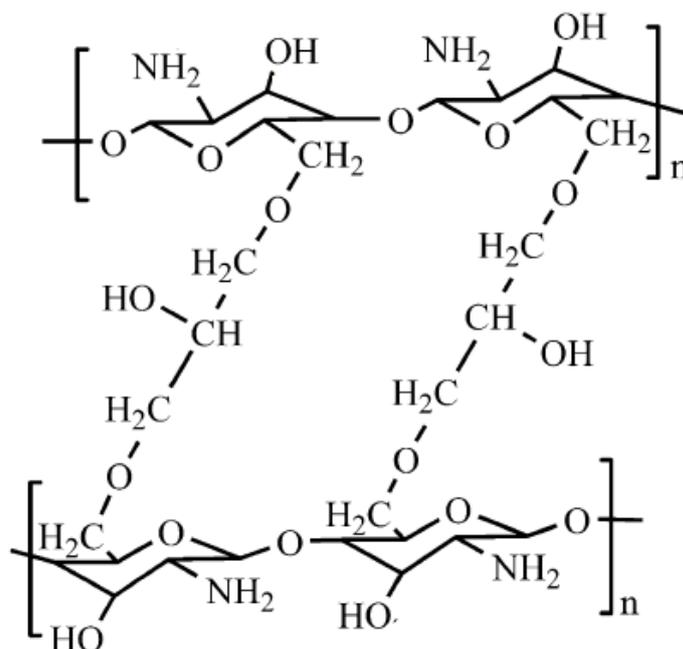
Santos 2009 realiza em seu trabalho, a caracterização e modificação de filmes densos de quitosana, e por MFA, pode constatar uma rugosidade relativamente regular em sua superfície ( $R_a = 1,323 \text{ nm}$ ), já que seus filmes foram preparados a partir de uma solução de 1% de quitosana, e os mesmos, não foram neutralizados em NaOH.

Beppu et. al. 1999, caracterizou estruturas densas de quitosana em diferentes concentrações de uma solução de NaOH (0,12; 0,25; 0,5; 1,0), e pode constatar por MFA que aumentando o valor da concentração do meio coagulante, a superfície das membranas de QTS, apresentam significativamente um aumento da rugosidade.

#### 4.1.4 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QTS COM EPICLORIDRINA SOBRE O COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE A VAPORES DE ÁGUA

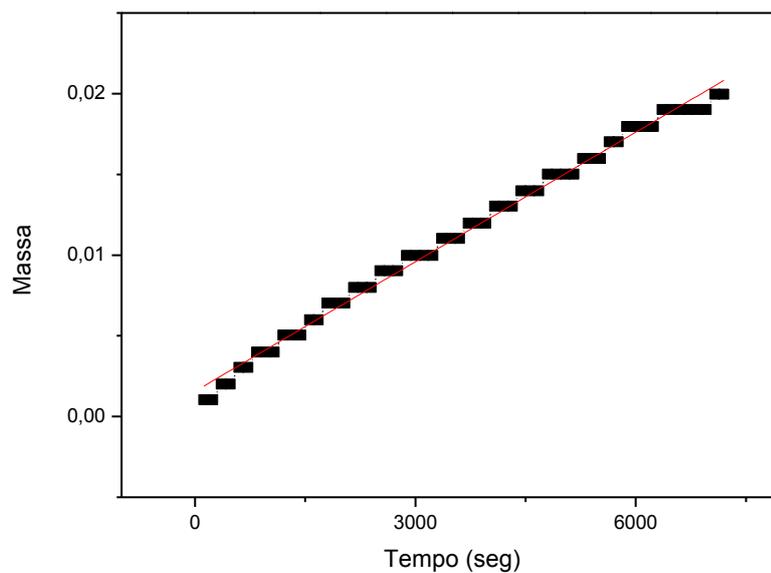
A análise teve como objetivo registrar as mudanças que a modificação poderia originar na permeabilidade a vapores de água dos filmes de quitosana com epicloridrina, considerando que a modificação acontecerá através dos

grupos hidroxilas (Figura 47) onde provavelmente deve modificar a interação permeante-permeado e conseqüentemente a permeabilidade ( $P = DH$ ), (D e coeficiente de difusão e H coeficiente de solubilidade de Henry, onde o produto DH é denominado coeficiente de permeabilidade) (Galego, 2002) dos filmes QTS e QTS-EPC.

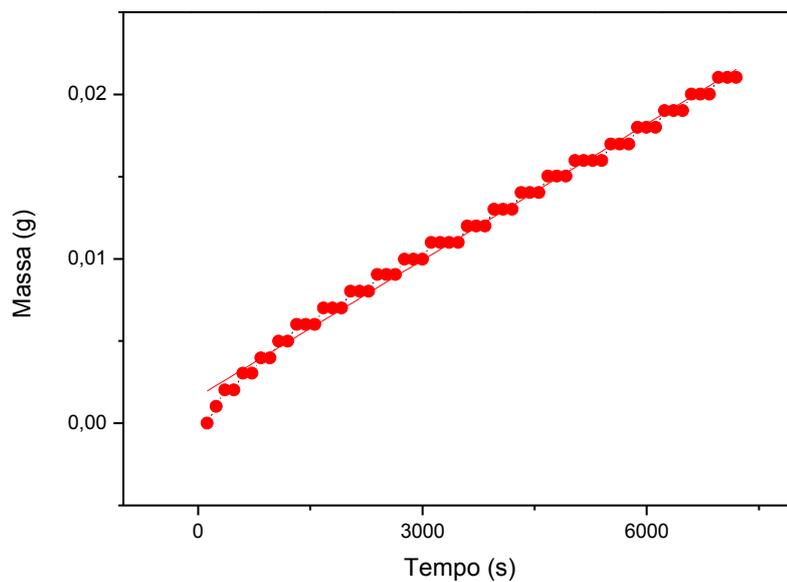


**Figura 47** – Representação da ligação covalente entre a quitosana e a epiclorigrina

Na figuras 48 e 49 estão representadas as curvas de massa permeada versus tempo para as duas formulações dos filmes de QTS e QTS/EPC em uma temperatura de 50°C.



**Figura 48** - Gráfico massa versus tempo do filme de QTS



**Figura 49** - Gráfico massa versus tempo do filme de QTS/EPC

Os coeficientes de permeabilidade ao vapor de água dos filmes de QTS e QTS-EPC (Tabela 8) são marcadamente diferentes, comportamento que considerando a natureza e a possibilidade de estabelecer uma interação maior na quitosana dada a disponibilidade de grupos hidroxila o que diretamente

deve influenciar no coeficiente de solubilidade de Henry ( $P=DH$ ) e consequentemente no coeficiente de permeabilidade.

**Tabela 8** – Coeficiente de permeabilidade ao vapor de água para filmes de QTS e QTS/EPC

Filme	Coeficiente de Permeabilidade x 10 <sup>10</sup> (Barrer)	Temperatura (°C)
QTS	33,4	50
QTS/EPC	17,3	50

Estes resultados, além de ser inéditos no estudo do sistema QTS e QTS-EPC, constituem mas uma evidência da modificação originada pelo tratamento com epícloridrina da QTS.

#### 4.1.5 – HIDROFILICIDADE DA QTS E QTS/EPC

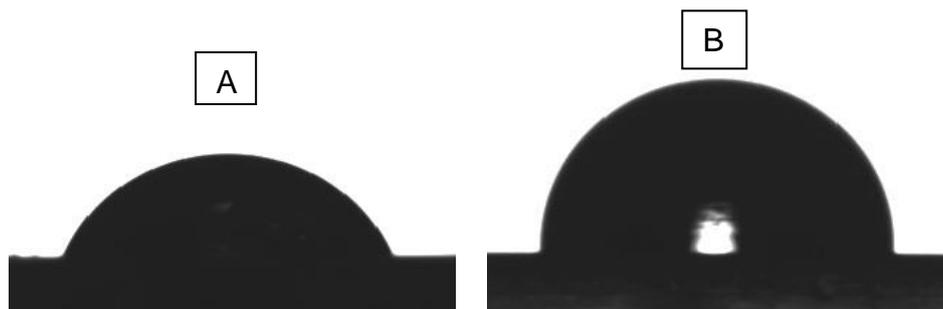
A modificação realizada com a EPC nos filmes de quitosana, apresentou uma hidrofílicidade diferente em comparação ao filme não modificado. A análise de ângulo de contato teve como intuito de determinar o caráter hidrofóbico dos filmes de QTS e QTS/EPC, pois tal impacto na mudança da hidrofílicidade pode ocasionar alguns fatores de risco na atividade da enzima imobilizada (Carvalho, 2012).

A tabela 9 relaciona os valores do ângulo de contato (°), com a água, substrato polar capaz de estabelecer uma ponte de hidrogênio com os grupos hidroxila na superfície dos filmes de QTS e QTS/EPC.

**Tabela 9** - Medidas de ângulo de contato da quitosana de partida e modificada

Líquido	Sólido	Ângulo (°)	Sólido	Ângulo (°)
Água	Quitosana	70,2	Quitosana/EPC	93,2
Água	Quitosana	69,7	Quitosana/EPC	92,8
Água	Quitosana	69,3	Quitosana/EPC	92,6
Água	Quitosana	68,9	Quitosana/EPC	92,2
Água	Quitosana	68,5	Quitosana/EPC	91,9
Água	Quitosana	68,1	Quitosana/EPC	91,4
Água	Quitosana	67,8	Quitosana/EPC	90,9
Água	Quitosana	67,3	Quitosana/EPC	90,5
Água	Quitosana	66,9	Quitosana/EPC	90
Água	Quitosana	66,5	Quitosana/EPC	89,6
	<b>Média</b>	<b>68,32 ± 1,22</b>	<b>Média</b>	<b>91,51 ± 1,23</b>

Os resultados indicam que a média do ângulo de contato da quitosana modificada (QTS/EPC) 91,51° apresentou um aumento significativo em relação à quitosana de partida (QTS) 68,32°, ou seja, tem uma menor capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio ou um menor número destes com a água. Desta forma podemos concluir que com a modificação do polímero, sua superfície apresentou uma diminuição no caráter hidrofílico, em relação a superfície do filme de QTS.



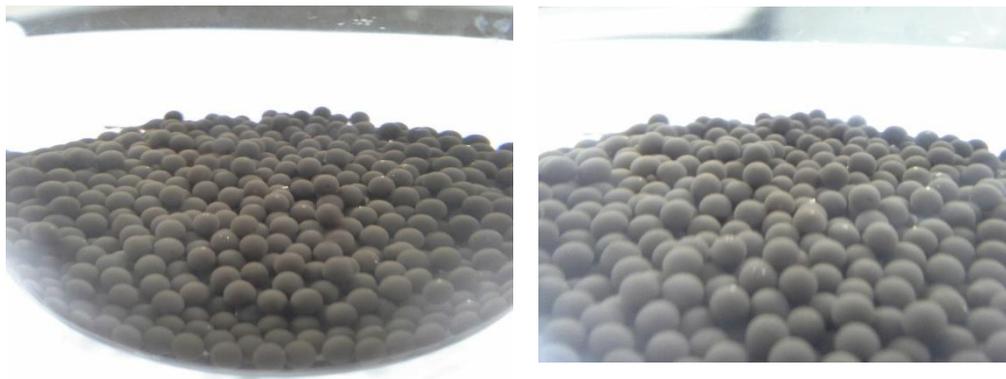
**Figura 50** – Mostra da gota de água depositada sobre a superfície do filme de QTS (A); filme QTS/EPC (B)

A figura 50 (A) mostra o instante em que acontece a interação da gota de água com a superfície do filme QTS, neste caso é nítida a visualização de que a gota está tendo uma maior interação com o filme. Já a figura 50 (B), pode observar que a gota está interagindo parcialmente com o filme de QTS/EPC. Com essa modificação é possível perceber que a molhabilidade do filme modificado é menor ao ser submetido a modificação com EPC.

Carvalho 2012, apresentou em seu trabalho o estudo da modificação de polímeros naturais em relação a sua hidrofobicidade, pela análise de ângulo de contato pode comparar a modificação estabelecida entre os polímeros. Em seu resultado pode observar que a média do ângulo de contato, para os filmes de QTS, ficou em torno de  $66,5^\circ$ . Tal resultado corrobora com a média encontrada neste trabalho.

#### 4.2 – FORMULAÇÃO DE MICROESFERAS DE QUITOSANA MODIFICADA COM EPC CONTENDO NÚCLEO MAGNÉTICO

A formulação das microesferas magnéticas, se deu pelo método de coagulação, onde a partir de uma solução de quitosana na qual estava dispersa a fase magnética, foi possível obter microesferas bastante uniformes, apresentando uma geometria esférica regular (sem presença de cauda) (Figura 51).



**Figura 51** – Imagens de esferas de quitosana – magnetita em solução de hidróxido de sódio

Após a formulação das microsferas de QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , elas foram submetidas ao processo de modificação usando a EPC, que por sua vez, não apresentou modificações macroscópicas na morfologia das microsferas, mantendo a mesma esfericidade (Figura 52).



**Figura 52** – Imagem das esferas de QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  após o processo de modificação com EPC.

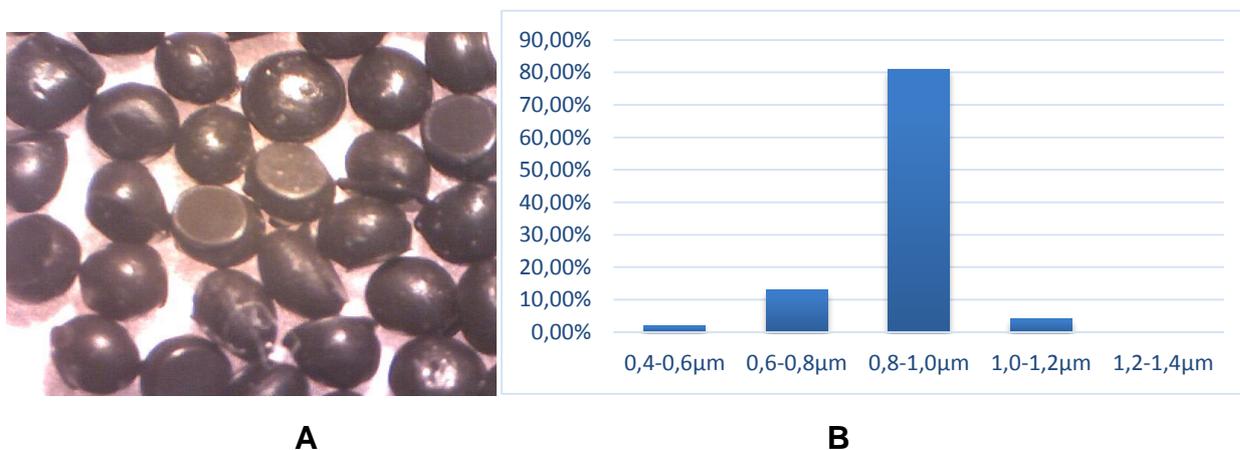
O procedimento desenvolvido para produção de microesferas QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e QTS-EPC/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  teve em média, um rendimento próximo a 80%. Este rendimento só foi possível controlando os seguintes parâmetros: velocidade do fluxo do gotejamento, o fluxo do gás inerte e a altura do gotejador em relação à superfície da solução coagulante. Tendo esses parâmetros bem definidos foi possível obter um resultado bastante surpreendente.

#### 4.3 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS

A metodologia de preparação das microesferas foi direcionada para a obtenção de micropartículas com uma distribuição de tamanho estreita e tamanho próximo a 1mm com o propósito de propiciar uma distribuição uniforme no leito fluidizado do reator evitando a formação de caminhos preferenciais.

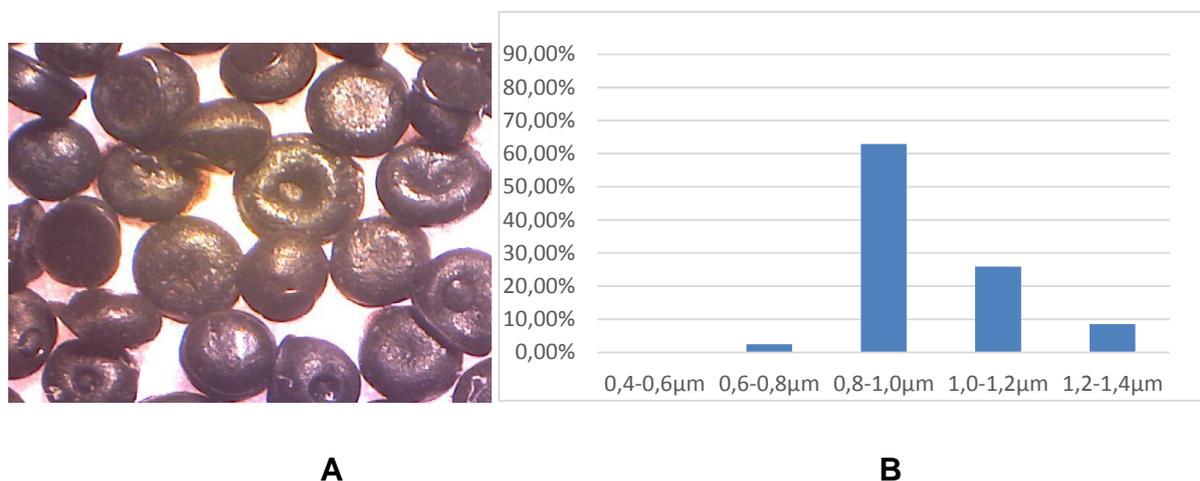
A realização da análise de distribuição de tamanho foi realizada através do cálculo do tamanho médio, onde foi utilizada 4 micrografias, cada uma contendo aproximadamente 25-30 microesferas.

Para as microesferas de quitosana/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  após a secagem (Figura 53, Tabela 10) o máximo de distribuição está localizada numa faixa menor, entre 800-1000 $\mu\text{m}$ , conforme pretendido (Figura 53A).



**Figura 53** – Micrografia ótica (A), gráfico da distribuição das microesferas de QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (B).

Para às microesferas de QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> após a secagem (Figura 54, Tabela 10) apresentaram um valor máximo de distribuição numa mesma faixa, em relação à QTS/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, entre 800 - 1000µm.



**Figura 54** – Micrografia ótica (A), gráfico da distribuição das microesferas de QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>(B).

Na tabela a seguir estão relacionados os valores da distribuição de tamanho para as microesferas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e as de QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Tendo em vista que para ambas as formulações, obtivemos uma boa distribuição localizada na mesma faixa de tamanho.

**Tabela 10** – Distribuição de tamanho das microesferas

Suporte pelo método de coagulação	Distribuição de tamanhos (%)				
	0,4-0,6µm	0,6-0,8µm	0,8-1,0µm	1,0-1,2µm	1,2-1,4µm
QTS/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	2%	13%	81%	4%	0%
QTS-EPC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0%	3%	63%	26%	9%

A metodologia de secagem utilizada, fez com que surgissem deformações geométricas nas microesferas, pois tendo como superfície de contato as placas petri, sua base ficou achatada Figuras 53(A) e 54(A), tanto para as microesferas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> quanto para QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/EPC. O que indica a necessidade de modificar a metodologia de secagem, para manter a simetria esférica obtida no processo de coagulação, exatamente antes da secagem.

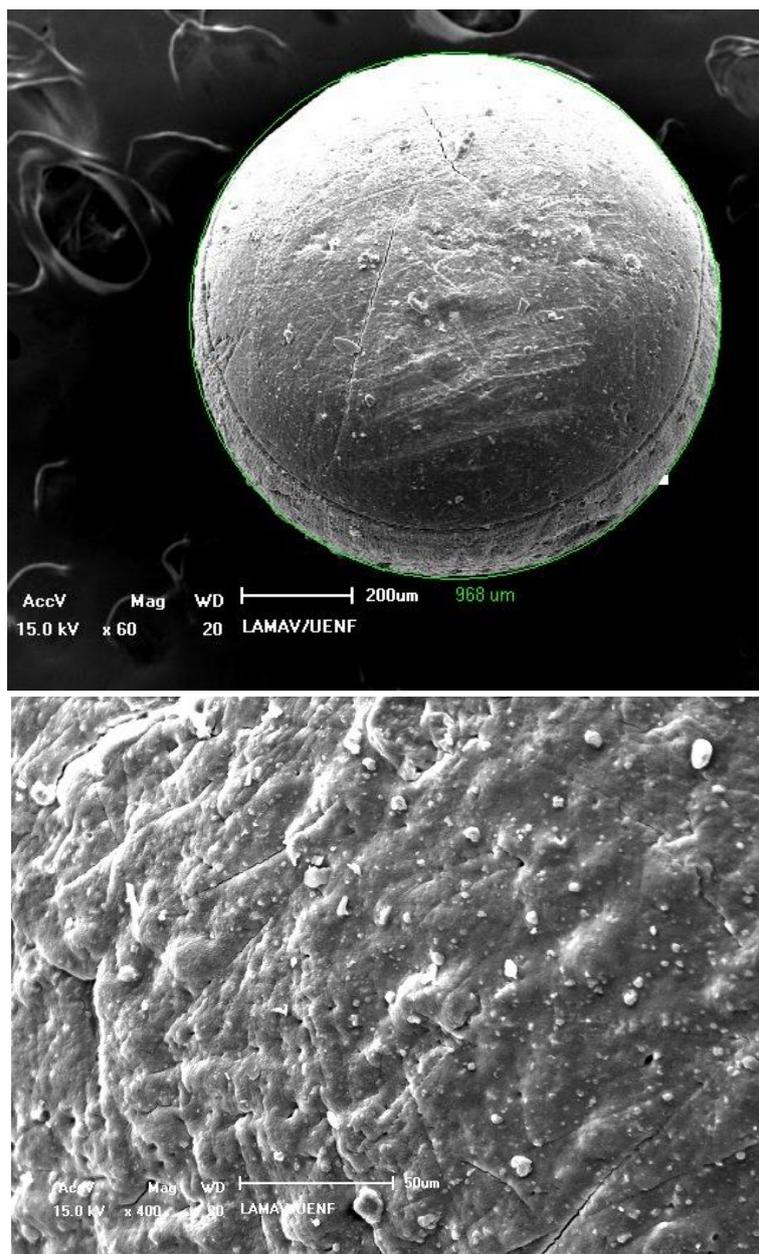
Microesferas de quitosana obtidas pelo procedimento de coagulação foram formuladas por Gonçalves et. al. e Carvalho et. al., onde a faixa de distribuição de tamanho teve uma média de 0,79mm e 0,6-0,9mm respectivamente, obtendo assim, microesferas com formatos uniformes e uma geometria regular.

Assim sendo, o método utilizado neste trabalho, para a modificar microesferas, não implica na mudança morfológica das mesmas, já que o resultados obtidos corrobora com a literatura citada.

#### 4.4 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DAS MICROESFERAS DE QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> E QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Nas imagens de MEV das microcápsulas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> podemos constatar uma microesfera regular, tendo uma ampla área superficial com um diâmetro de 968 μm (Figura 55 A). Nota-se que a superfície apresenta um aspecto rugoso (55 B).

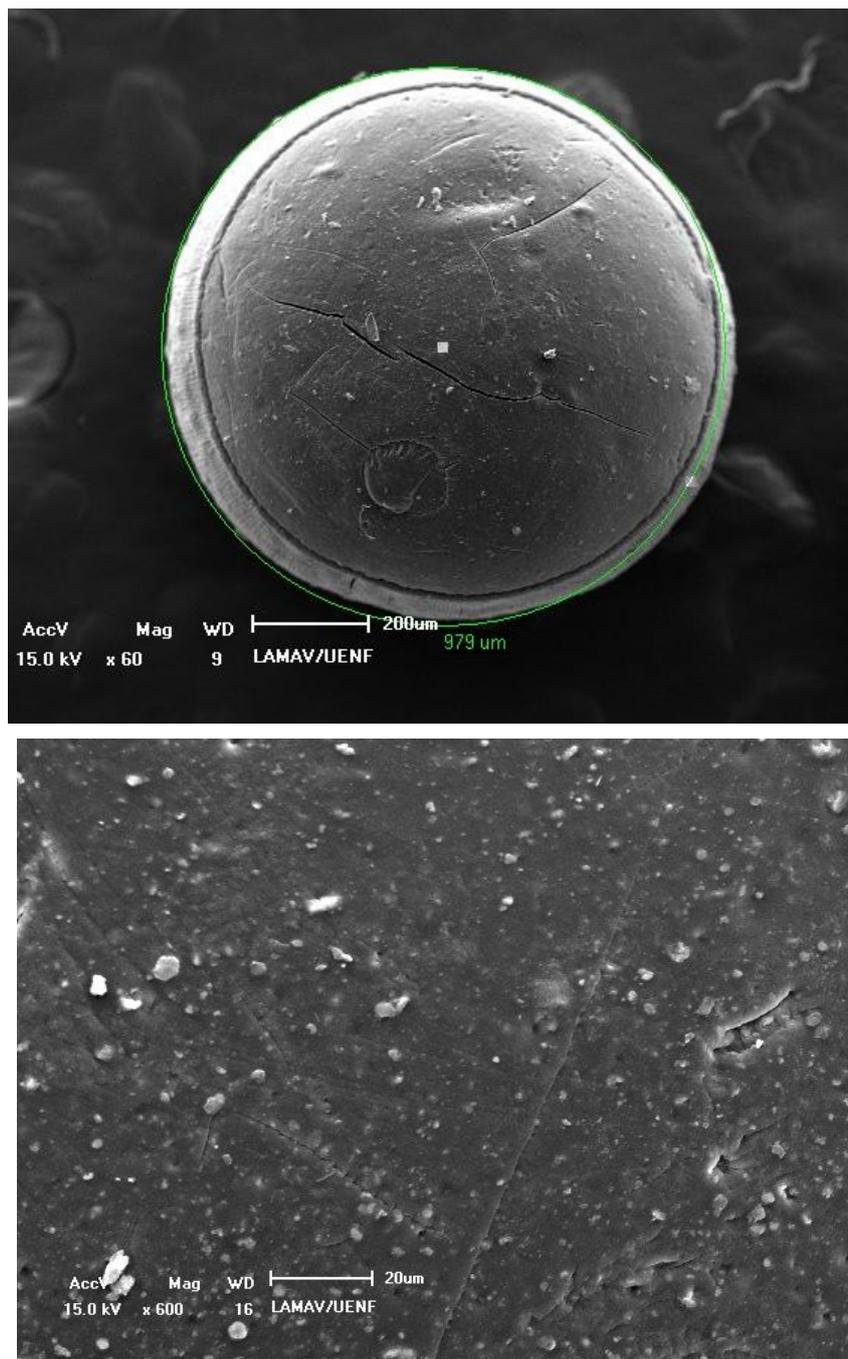
Com a introdução da EPC nas microcápsulas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, houve uma alteração significativa na superfície, obtendo uma melhor uniformidade, está característica e possível perceber na Figura 56 B, onde a morfologia superficial das microesferas foram ajustadas, formando provavelmente uma superfície mais densa, mantendo suas dimensões naturais, tendo um diâmetro médio de 979 μm (Figura 56 A).



**Figura 55** – Micrografias eletrônicas das microcápsulas (A) microesferas QTS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , (B) micrografia da superfície da microesfera QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$

Com a modificação da QTS utilizando a epiclorigidrina como agente modificante, foi possível constatar que a morfologia da superfície apresentou uma diminuição da rugosidade, tais valores corroboram com os resultados obtidos por AFM.

Além dessas principais características, é possível perceber em ambas as microesferas, pequenas fissuras, principalmente nas microesferas de QTS-EPC/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .



**Figura 56** – (A) microsferas QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, (B) micrografia de superfície da microsfera QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

A morfologia superficial das microsferas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> formuladas pela técnica de coagulação, não apresenta irregularidades nem macroporosidade. Suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na

sua superfície externa, o que facilita a interação catalisador com o substrato. (Canilha *et. al.*, 2006; Carvalho, 2012).

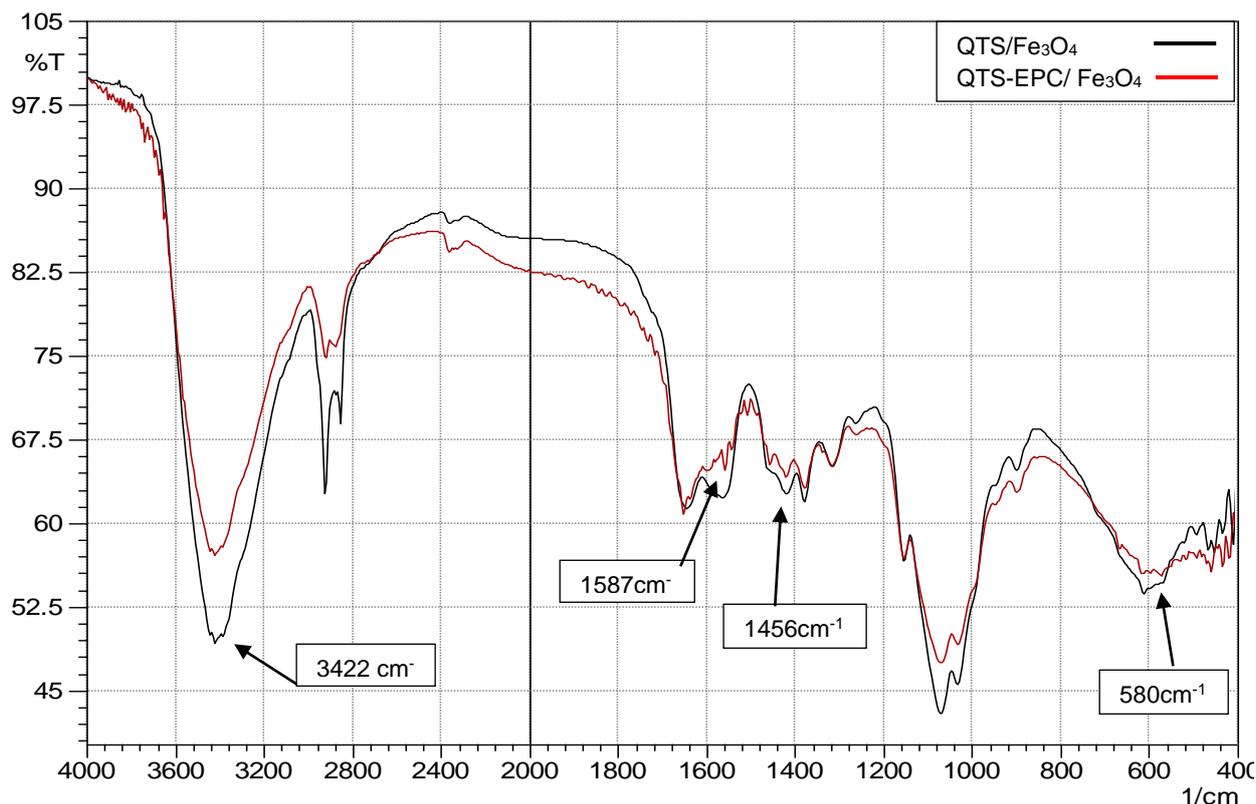
#### 4.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS COM PROPRIEDADES MAGNETICAS

##### 4.5.1 – ESPECTROMETRIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros de FTIR (Figura 57) obtidas a partir das microcápsulas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, não apresentam diferenças significativas dado que ambas as estruturas apresentam vibrações e deformações de agrupamentos funcionais semelhantes, entretanto é possível destacar as modificações originadas pela reação com a epícloridrina.

Na região entre 4000- 2000 cm<sup>-1</sup> se observa uma banda intensa, a 3422 cm<sup>-1</sup> é devida as vibrações dos estreitamentos dos grupos O-H e N-H, já a banda em 2863 cm<sup>-1</sup> é derivada da vibração simétrica dos agrupamentos CH<sub>2</sub>. Na faixa de 2000-1400 cm<sup>-1</sup> a banda a 1587 cm<sup>-1</sup> é associada às vibrações das ligações C-O-C (Liu *et. al*, 2012), apresenta um aumento de 1,25 para 1,3 de sua intensidade relativa ( $r = I_{COC}/I_{OH}$ ) em relação a banda de 3422 cm<sup>-1</sup> associada aos agrupamentos O-H envolvidos na modificação com a epícloridrina. E na faixa de 580 cm<sup>-1</sup>, é atribuída as vibrações dos grupos Fe-O, pertencentes a magnetita introduzida nas microesferas.

Um outro evento observado, foi o aparecimento de u sinal pouco intenso para ambos os espectros, localizado na faixa de 1463 cm<sup>-1</sup>, sendo identificado como as vibrações do grupo N-H secundários, tal ocorrência é devido em pequena extensão dos grupo -NH<sub>2</sub> da quitosana, provando que esses grupos não foram afetados com a modificação, levando em consideração a preferência da epícloridrina pelos grupos hidroxilas (-OH) presente na cadeia.



**Figura 57** – Espectro de infravermelho QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (a) e QTS-EPC/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (b)

Kuo et. al. 2012, formularam nanopartículas de quitosana- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , afim de promover um suporte para imobilização da lipase de *Candida rugosa*. Em comparação com os espectros de FTIR, e possível estabelecer uma relação entre as faixas obtidas. Na região de 3420  $\text{cm}^{-1}$  (alongamento do grupo -OH), em 1645  $\text{cm}^{-1}$ , é atribuído as vibrações do alongamento do grupo amida (C=O), e em 580  $\text{cm}^{-1}$  e o surgimento de uma relevante vibração relacionada com os grupos Fe-O, comprovando a presença de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

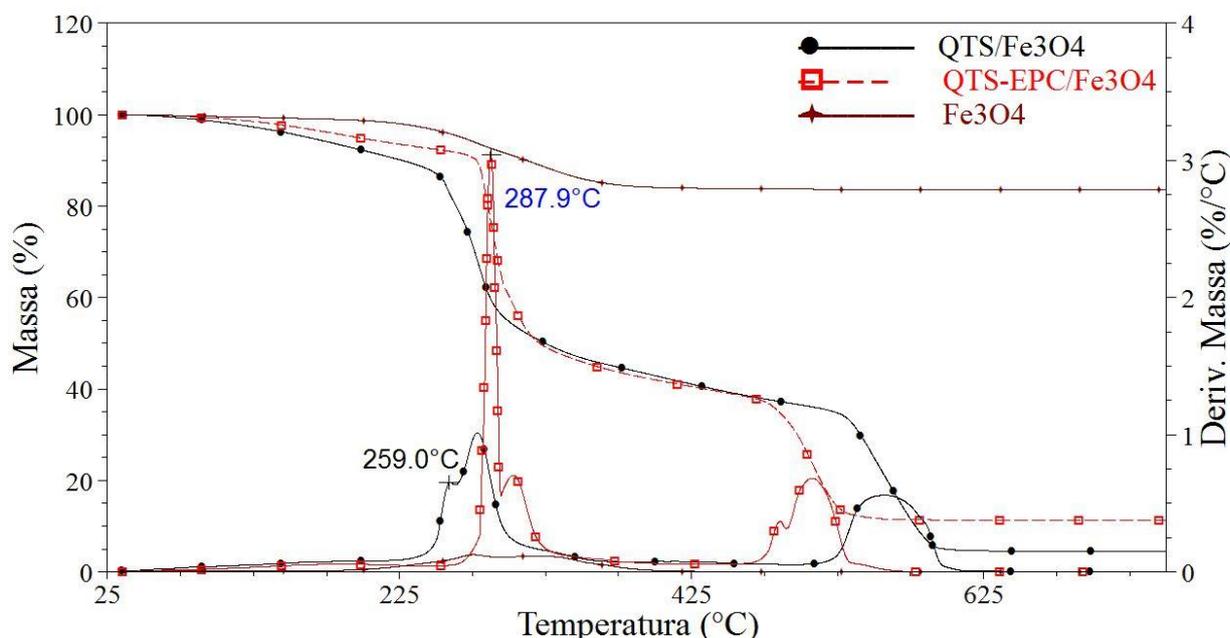
Espectros de FTIR similares foi observado por Silva et. al. 2010, onde foi possível identificar os grupos atribuídos a quitosana pura e modificadas com epícloridrina. Na região de 3400  $\text{cm}^{-1}$  atribuição dos grupos hidroxila (-OH). Na faixa de 1000-2000  $\text{cm}^{-1}$ , estão atribuídas as vibrações de estiramentos do tipo C-O, e na região entre 1300-1400, encontra-se deformações das ligações do tipo C-H.

## 4.6 – DETERMINAÇÃO DA CARGA MAGNETICA E ESTUDO DO COMPORTAMENTO TERMICO DAS MICROESFERAS

### 4.6.1 – TÉCNICA TERMOGRAVIMETRICA(TGA)

Com a introdução da epiclоридrina como agente de modificação, fez com a estabilidade térmica da microesferas de QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , se deslocasse para valores mais altos, como pode ser observado na Figura 58. Além disso, com o estudo termogravimétrico das microesferas, assim como da magnetita estabilizada utilizada na formulação, permitiu calcular a carga de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) presente nas microesferas QTS e QTS-EPC (23% da massa total).

O evento térmico observado a partir de 240°C com uma temperatura de pico de 259°C é atribuído a decomposição e eliminação dos voláteis nas microcápsulas de QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e numa temperatura de 267°C com temperatura de pico de 287,9°C para as microcápsulas QTS-EPC/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .



**Figura 58** – Curvas termogravimétricas do  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  estabilizado e das microcápsulas QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e QTS-EPC/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$

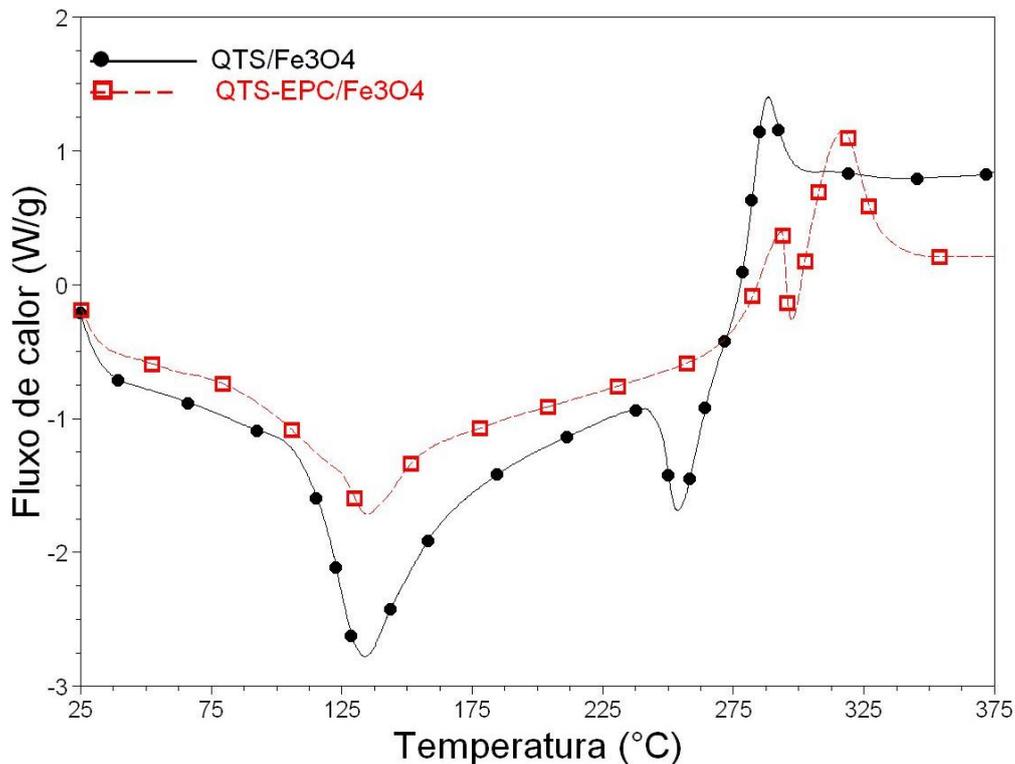
Coelho 2006, observou em seu trabalho que ao modificar esferas de quitosana com epícloridrina, a estabilidade térmica, deslocava para valores mais baixos, onde com o estudo termogravimétrico, pode constatar que para as esferas QTS houve um evento pronunciado a 332,15°C (49,68%), já para as microesferas de QTS-EPC o evento térmico foi observado a 275,35°C (44,94%), sendo evidente a perda de estabilidade após o tratamento com a epícloridrina.

Torres e seus colaboradores estudaram a resistência térmica, mecânica e química de microesferas de quitosana modificadas quimicamente, usando três tipos de modificações, incluindo a modificação com epícloridrina. Suas microesferas, após a modificação química apresentaram uma estabilidade na temperatura de degradação térmica para a quitosana natural e para a modificada com epícloridrina em torno de 300°C, não havendo descolamentos da estabilidade térmica para valores mais baixos ou para valores mais altos, mantendo a estabilidade constante.

#### 4.6.2 – CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATORIA (DSC)

As análises calorimétricas realizadas com auxílio da técnica de DSC (Figura 59) das microcápsulas QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> confirmaram a menor capacidade de absorção de água das microcápsulas reticuladas e o aumento da estabilidade térmica observada na análise termogravimétrica.

Os picos endotérmicos (50-160°C) observado em ambas as curvas estão associados a remoção de água das microcápsulas QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> com variações de entalpia de 297 e 186 J/g respectivamente resultado que confirma a menor capacidade de retenção da água das microcápsulas QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.



**Figura 59** – Curvas de DSC das microcápsulas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>

Também se observa nas microcápsulas de QTS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a existência de uma transição exotérmica em 295°C, identificada como a degradação da fração de quitosana. Já em relação as microesferas de QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, é nítido o aparecimento de duas transições exotérmicas, onde a primeira se localiza em 293,5°C, devido a decomposição da epícloridrina presente na cadeia polimérica; a segunda transição esta localizadas em torno de 325°C, atribuída a decomposição dos grupos glicosídeos ainda presente na quitosana.

Dong et. al.; 2014, desenvolveram em seu trabalho nanopartículas de quitosana-magnetita, modificadas com epícloridrina, onde com o auxílio da técnica de DSC, pode constatar que para as nanopartículas de quitosana houve estágios de perda de massa em torno de 200-288°C, devido a decomposição da quitosana e ainda uma transição abaixo de 200°C, atribuída a perda de água quimicamente. Já para as nanopartículas de quitosana modificada com epícloridrina, apenas apresentou transições exotérmicas, tendo um pico de degradação a 243°C.

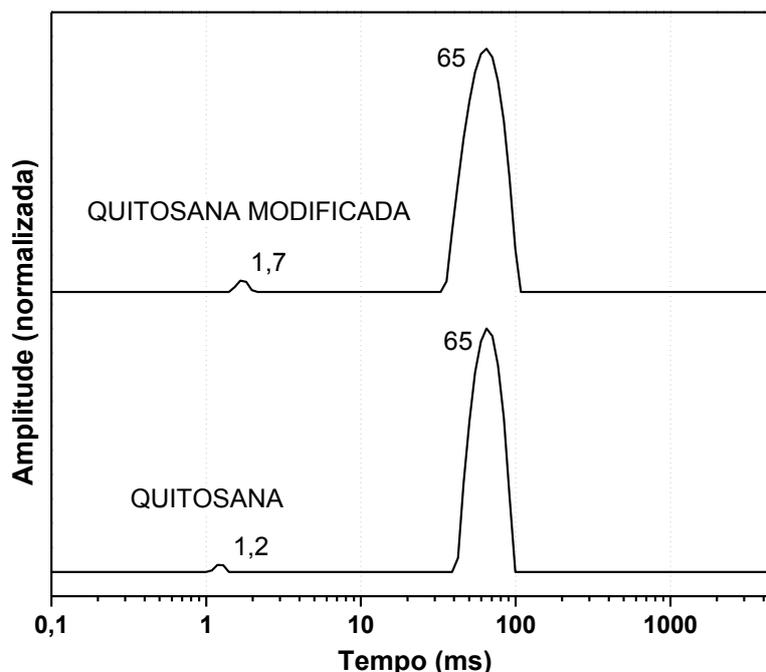
A menor capacidade de retenção de água é um fator muito importante em relação a este trabalho, pois na hora de determinar a atividade enzimática

da lipase imobilizada, o excesso de água pode estimular reações competidoras, fazendo com que o sítio ativo das enzimas não entre em contato com o substrato, dificultando a realização da reação de transesterificação, uma vez que lipases em meio aquoso usualmente catalisam reações de hidrólise.

Com os deslocamentos da estabilidade térmica da QTS-EPC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> tanto na análise de TG e DSC permitiu então comprovar que houve uma modificação estrutural das microesferas, confirmando a eficiência da modificação do suporte a base de quitosana.

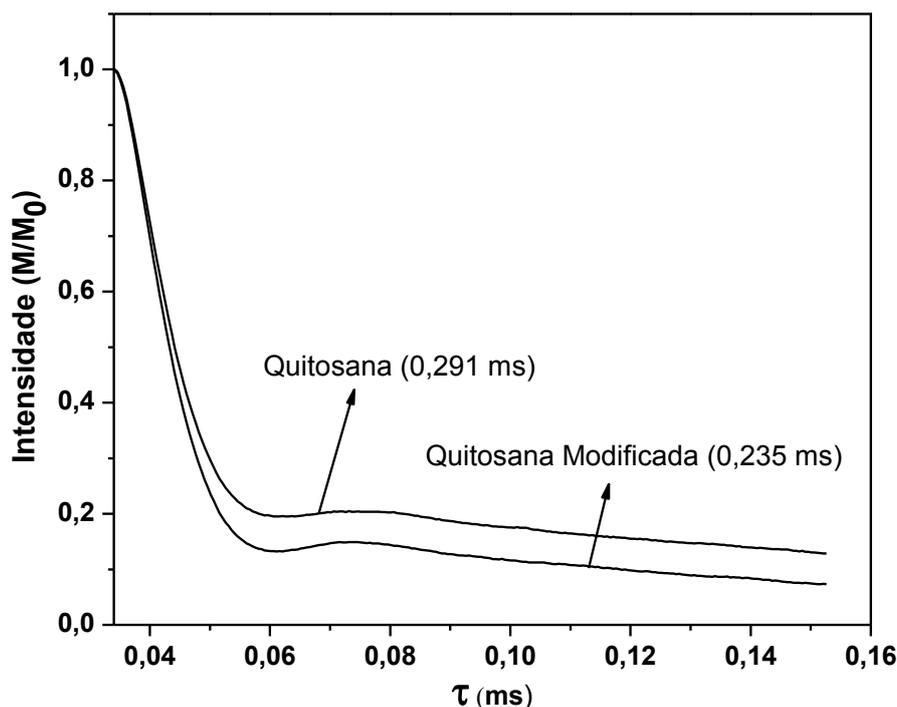
#### 4.7 – RESSONANCIA MAGNETICA NUCLEAR (RMN) <sup>1</sup>H

O ensaio de inversão-recuperação não apresentou mudanças significativas na mobilidade molecular com a modificação da quitosana (Figura 60). Entretanto, o processo de modificação implicou em um material com o domínio em 65ms ligeiramente mais alargado, indicando, possivelmente, um material com maior número de conformações diferentes da estrutura molecular.



**Figura 60** – Distribuição de domínios de tempo de relaxação longitudinal ( $T_{1H}$ ) obtida por inversão-recuperação para a quitosana pura e modificada.

O “solid-echo” é uma sequência que, em linhas gerais, fornece a mesma curva de decaimento que o FID (decaimento livre de indução). Entretanto o resultado apresenta uma relação sinal/ruído muito superior, com linhas mais suaves e com melhor resolução, possibilitando um ajuste para o cálculo do tempo de relaxação mais correto.



**Figura 61** – Tempos de relaxação transversal ( $T_{2H}$ ) obtidos por solid-echo para a quitosana pura e modificada.

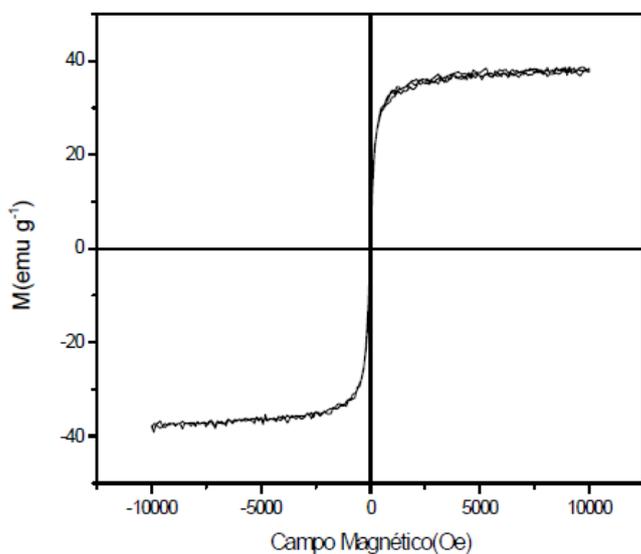
O tempo de relaxação transversal irá analisar a relaxação de segmentos de cadeia, diferentemente da longitudinal, que avalia domínios maiores.

A partir das curvas obtidas, sugere-se que a modificação realizada tornou a quitosana um pouco mais rígida. Na relaxação longitudinal ( $T_{2H}$ ) (Figura 61) quanto mais rapidamente o sinal decai, mais rígida é a amostra. Isto ocorreu devido ao aumento da heterogeneidade do sistema, que se formaram quando da modificação da quitosana, confirmando observado por  $T_{1H}$ .

Essa rigidez nas microfibras de quitosana após a modificação possibilita a utilização das mesmas em um reator de leito fluidizado. Ao receber o campo magnético essas microesferas vão sofrer forças mecânicas entre si, esta rigidez irá então tornar o suporte mais forte, evitando que os mesmos se degradem com a colisão.

#### 4.8 – PROPRIEDADE MAGNÉTICA DA CARGA DE MAGNETITA NO SUPORTE POLIMÉRICO

As medidas de magnetização da magnetita figura 62 (A) e das micropartículas contendo os núcleos magnéticos de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram realizadas para caracterizar o comportamento magnético. O resultado apresentou uma curva sem histereses, não havendo nenhum tipo de magnetização permanente ou indução residual, caracterizando um comportamento super paramagnético. A magnetização de saturação foi de  $38 \text{emu g}^{-1}$  valor que está dentro do intervalo esperado entre  $30\text{-}50 \text{emu/g}$  segundo Schuth e colaboradores (2007).



(a)



**Figura 62** - Curva de magnetização para a magnetita (a) e magnetita atraída pelo ímã (b).

Este comportamento super paramagnético observado nas nanopartículas de magnetita com relativa elevada magnetização de saturação são particularmente importante, pela possibilidade de controlar dentro do reator a distribuição das partículas magnéticas, que constituem o biocatalisador no leito fluidizado assistido assim como as possibilidades de operar no reator com fluxos maiores e fácil recuperação do biocatalisador.

Bhatt et. al. 2010, formularam a síntese de nanopartículas de magnetita, a partir do método hidrotérmico, e com o auxílio da técnica de VSM, foi possível estabelecer a magnetização de saturação da  $Fe_3O_4$  um valor próximo a 17,85 emu/g.

Dong et. al. 2014, usaram o método de co-precipitação de  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , para sintetizar nanopartículas de magnetita, obtendo assim uma magnetização de saturação, em média de 44,43 emu/g.

Zhang et. al. 2009, mostram em seu trabalho que as nanopartículas magnéticas exibiram uma excelente susceptibilidade magnética, tendo como resposta um campo magnético aplicado, e sua magnetização de saturação (MS) foi determinada como sendo 52,6 emu/g.

Existem alguns fatores que podem interferir no valor da magnetização de saturação de nanopartículas de  $Fe_3O_4$  sintetizadas, tendo em destaque o tamanho das nanopartículas e o método de síntese adotado, que geralmente é menor que o valor teórico (96,4 emu/g) devido a heterogeneidade superficial. Sem levar em conta que com a adição de um surfactante, para estabilizar as nanopartículas, faz com que o valor da magnetização de saturação seja reduzido (Dodi et. al; 2012).

Em relação à literatura citada a magnetização de saturação encontrada neste trabalho foi um pouco menor, pois com a diminuição no tamanho das partículas e o uso de um surfactante (Tween), pode levar a um aumento da relação superfície-volume, o que por sua vez provoca mais desordem rotação superfície, e conseqüentemente uma redução na magnetização de saturação.

## 4.9 – ATIVIDADE CATALITICA

### 4.9.1 – IMOBILIZAÇÃO POR LIGAÇÃO COVALENTE E ATIVIDADE HIDROLITICA

A quitosana, assim como as enzimas, possui grupamentos amino em sua superfície de forma que não existe afinidade química entre ambas. Então, para imobilização de enzimas em suportes com quitosana é necessário, inicialmente a utilização de um agente ativador que se liga a sua estrutura e possibilita sua ligação as enzimas.

O procedimento de imobilização envolve a formação de ligações covalentes entre amino grupos funcionais presentes na superfície do suporte e os grupos funcionais da enzima. Numa primeira etapa, antes da imobilização, os grupos aminos do suporte, foram modificados pelo glutaraldeido que introduz, na superfície do suporte, agrupamentos (-COH) os quais são susceptíveis a reações com os grupos amina nucleofilicos da lípase, promovendo uma ligação da enzima ao suporte ativado. (Cardoso, 2009).

O ativador funciona também, como um braço que distancia a enzima do suporte, diminuindo possíveis impedimentos estéricos causados pela proximidade da enzima a superfície do suporte.

A atividade enzimática de uma enzima é uma propriedade relacionada com sua estrutura macromolecular. Desta forma, quando uma enzima é imobilizada em um suporte podem acontecer alterações que resultam em perda da atividade enzimática. Estas alterações podem ser atribuídas a um conjunto de fatores, embora na maioria das vezes de difícil quantificação, mas que poderiam ser os argumentos para tentar compreender os resultados observados.

Para o procedimento de imobilização empregou-se um carregamento fixo das lípases Amano AK e Flip Br por grama de suporte (Tabela 11).

O cálculo da titulação e as atividades enzimáticas das enzimas imobilizadas nos respectivos suportes estão resumidos nas tabelas 11 e 12 respectivamente.

**Tabela 11** – Resultados obtidos na titulação

<b>Ezimas</b>	<b>Vol.NaOH</b>	<b>va-vb</b>	<b>Massa mg/ml</b>	<b>Massa (em g em 11,7 ml)</b>
Amano AK Livre	119,53	103,23	0,5	0,005
Flip BR Livre	96,93	80,63	0,4	0,004
Amano AK Livre	67,83	51,53	0,45	0,005
Flip BR Livre	87,88	71,58	0,47	0,005
Residual QTS Amano AK	56,88	40,58	0,1694	0,0019
Residual QTS Flip BR	35,65	19,35	0,1016	0,0011
Residual-QTSEPC Amano AK	57,75	41,45	0,1694	0,0019
Residual QTSEPC FlipBR	38,4	22,1	0,0677	0,0007

**Tabela 12** - Valores das atividades enzimática das enzimas Amano AK e Flip BR nos suportes poliméricos de partida e modificado.

Suportes para Imobilização	Atividade Enzimática (U/g)	
	Amano AK	Flip BR
QTS/ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	11590	27396
QTS - EPC/ Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	25601	23973
Enzima livre	35290	34113

Os valores da atividade hidrolítica da enzima Amano AK em relação aos suportes de QTS/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e QTS - EPC/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foram bastante diferentes, tendo um elevado aumento da atividade com o suporte modificado. Tal característica é devido a introdução da EPC, onde deve ter ocasionado mudanças na

morfologia superficial do polímero em relação ao caráter hidrofóbico, este resultado foi confirmado pela realização da análise de ângulo de contato, que constatou a mudança na hidrofiliidade do suporte.

Os valores da atividade hidrolítica da enzima Flip BR em relação aos suportes de QTS/  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e QTS - EPC/  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  apresentaram uma pequena diferença, tendo um decaimento da atividade com o suporte modificado.

Segundo Georgio e Hubbell (1993), é possível distinguir três formas de interação que podem interferir na atividade de enzimas imobilizadas: a ligação da enzima na matriz pode resultar em mudanças conformacionais que afetam a função catalítica; o acesso do substrato ao sitio ativo da enzima pode ser afetado por impedimento estérico do suporte e as propriedades do suporte (como sua natureza hidrofílica ou hidrofóbica, ou a presença de cargas fixas) afetam o modo de ação da enzima.

Os experimentos de imobilização realizados mostraram que os suportes desenvolvidos, possuem potencial de imobilização, em comparação com a atividade da enzima na sua forma livre e imobilizada, podendo então, serem utilizados como biocatalisadores em processos de transesterificação enzimática em reatores assistidos por campo eletromagnético. Já que as microesferas modificadas apresentaram uma estrutura mais rígida, conseqüentemente tendo uma melhor resistência mecânica.

## CAPITULO 5 – CONCLUSÕES

A análise de infravermelho permitiu identificar a modificação introduzida pela reticulação na estrutura da QTS pela epícloridrina através da relação de intensidade das bandas dos agrupamentos hidroxilas a  $3422\text{ cm}^{-1}$  e da banda a  $1586\text{ cm}^{-1}$  devida as vibrações dos agrupamentos C-O-C.

Os resultados obtidos com auxílio das técnicas termogravimétricas e calorimétricas corroboraram a ocorrência de uma modificação das esferas de QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e o impacto desta modificação na capacidade de absorção de água das microcápsulas reticuladas (QTS-EPC/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) em relação às microcápsulas QTS/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  assim como no aumento da estabilidade térmica da estrutura da quitosana após reticulação.

Com a análise de MFA, foi possível constatar, que com a introdução da epícloridrina, como agente modificante, houve uma diminuição da rugosidade na superfície dos filmes de QTS.

Os resultados obtidos a partir da análise de ângulo de contato indicou que as modificações realizadas modificaram a hidrofiliabilidade do polímero utilizado na formulação do suporte como pretendido, ou seja, fez com que o filme modificado QTS/EPC ficasse mais quebradiço e hidrofóbico, tendo então, uma menor capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio ou um menor número destes com a água, pois os grupos alvo da modificação são os grupos hidroxila (- OH) da quitosana.

Através da análise de micrografia eletrônica de varredura podemos comprovar a eficiência da modificação, pois é evidente perceber a modificação para as micrografias da superfície dos suportes utilizados. A micrografia do suporte QTS/EPC apresentou uma superfície mais lisa, com menos rugosidade do que o suporte QTS, isso se deve a presença de ligações entrecruzadas proporcionada pelo reagente utilizado na modificação.

As microesferas formuladas de Quitosana/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e Quitosana – EPC/ $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , apresentaram um formato esférico regular (sem cauda) e tendo uma distribuição de tamanho relativamente uniforme, possibilitando então sua utilização em um reator de leito fluidizado, evitando assim, a formação de caminhos preferenciais no momento da reação de transerterificação.

Com a análise de MFA, mostra que com a introdução da epicloridrina, como agente modificante, há uma diminuição da rugosidade em relação a superfície dos filmes de QTS e os filmes de QTS/EPC.

Os biocatalisadores formulados em superfícies com características diferenciadas (hidrofilicidade e distanciamento da ligação covalente enzima-suporte) mostram um discreto efeito da natureza da imobilização sobre a atividade hidrolítica da enzima.

## CAPITULO 6 – RECOMENDAÇÕES

### 6.1 – RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para complementação o aperfeiçoamento deste trabalho, considerando as dificuldades encontradas, algumas propostas para estudos futuros são sugeridas:

1. Testar os biocatalisadores magnéticos produzidos em reação de produção de biodiesel em reatores assistidos por campo eletromagnético;
2. Caracterizar os biocatalisadores imobilizados quanto aos parâmetros cinéticos, estabilidade térmica e capacidade de reutilização;
3. Estudos mais conclusivos devem ser realizados quantificando os moles de enzima imobilizada;
4. Verificar a possibilidade (ou o potencial) de substituição da imobilização de enzimas comerciais por células inteiras, produtoras de lipase intracelular, visando a obtenção de biocatalisadores com menor custo.

## CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, Carlos. *Sustentabilidade Ambiental – O Que É a Sustentabilidade Ambiental*, 2010. Disponível em: <http://www.atitudessustentaveis.com.br/sustentabilidade/sustentabilidade-ambiental-o-que-e-a-sustentabilidade-ambiental/>.

ALMEIDA, Vanessa V. A., Bonafé, E. G., Stevanato, F. B., Souza, N. E., Visentainer, J. E. L., Matsushita, M., Visentainer, J. V. Catalisando a hidrólise da uréia em urina. **Química Nova na Escola**, nº 28, p. 42 – 46, 2008.

ALTER, H. The “Barrer” Permeability Unit. *Journal of Polymer Science*. vol. 6 p. 926. 1968.

BUSSAMARA, Roberta; DALL’AGNOL, Luciene; SCHRANK, Augusto; FERNANDES, Kátia Flávia; VAINSTEIN, Marilene Henning. Optimal Conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubiensis* (strain HB85A) lipase by adsorption in a packed bed reactor by response surface methodology. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. 2009.

CARVALHO, Elaine Aparecida Santos. **Caracterização estrutural e propriedades do (Acrilamidometil) acetato prepionato de celulose modificado via radicalar**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2008, 64p.

CARVALHO, Elaine Aparecida Santos. **Formulação e caracterização de biocatalisadores com núcleo magnético a partir de polímeros naturais**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2012, 122p.

CASTRO, H. F., Mendes, A. A., Santos, J. C., Aguiar, C. L. Modificação de óleos de gorduras por biotransformação. **Química Nova**, vol. 27, No. 1, p. 146 – 156. 2004.

CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Química Nova**, vol. 24, p. 612 – 615.

COMERLATO, M. H. **Imobilização de enzimas no suporte crisólita**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas – SP. 99p. 1995.

DALLA – VECCHIA, Roberto, Nascimento, Maria da Graça, Soldi, Valdir. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, vol. 27, No. 4, p. 623 – 630, 2004.

DALLAN, P.R.M. **Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – SP. 2005.

DIAS, Francisco S., Queiroz, Danilo C. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, Vol. 31, No. 1, p. 160 – 163, 2008.

DIAS, L.H.P.V. **Aplicações de técnicas fototérmicas ao estudo de propriedades físicas de polímeros biodegradáveis**. Dissertação (Mestrado) Campos dos Goytacazes – Rj. Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF, 101p. 2003.

EDGAR, K. J., Buchaman, C. M., Debenham, J. S., Rundquist, P. A., Seiler, B. D., Shelton, M. C., Tindall, D. Advanced in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science**, 2001, vol. 26, p. 1605 – 1688.

FERNANDES, L.L. **Produção e caracterização de membrana de quitosana e quitosana com sulfato de condroitina para aplicações biomédicas**. Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ. Rio de Janeiro – RJ. 63p. 2009.

FILHO, R.B.; MATTOSO, L.H.C. Estudo de polímeros por microscopia de força atômica. **Comunicado Técnico. Embrapa**. São Carlos – SP. ed. 1<sup>a</sup>. p.1-4. 2003.

FOGLER, H. Scott. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4.ed. Rio de Janeiro – RJ: LTC, 2012.

FURIGO, A., Salvador, A., Ribas, C., Maso, L., Palhares, S. **Biodiesel: Aspectos gerais e produção enzimática**. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis – SC, 2009, 27p.

GALEGO, N., Miguens. F.C & Sanchez. R. *Phisycal and Functional Characterization of PHAscl Membranes*. **Polymer**, v43, p.3109-3114, 2002.

GONÇALVES, L. R. B., Giordano, R. L. C., Silva, J. A., Filho, E. H. C., Adriano, W. S. Stabilization of Penicillin G Acylase by Immobilization on Glutaraldehyde – Activated Chitosan. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, n 22, 2005, p. 529 – 538.

GONÇALVES, V.L., Laranjeira, M.C.M., Fávère, V., Drago, V. Release of iron(III) from crosslinked chitosan microspheres. **Visão Acadêmica**, v.6, n.1, p.15 – 24, 2005.

GRIGOLON, Lisanne Beatriz. **Modificação de quitina e quitosana por via enzimática**. Dissertação (Mestrado). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química – UNICAMP, Campinas – SP. 99p. 2001.

HAN, Minghan., Yi, W., Wu, Q., Liu, Y., Wang, D. Preparation of biodiesel from waste oils catalyzed by a Bronsted acidic ionic liquid **Bioresour. Technol.**, vol. 100. p. 2308 – 2310, 2009.

HERMANN, P.S.P.; SILVA, M.A.P.; BERNARDES, R.; JOB, A.E.; COLNAGO, L.A.; FROMMER, J.E.; MATTOSO, L.H.C. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**. 1997.

<http://www.anp.gov.br/>. Acessado em 05/09/2012.

<http://www.mme.gov.br/programas/biodiesel/menu/biodiesel/pnpb.html>.

Acessado em 05/09/2012.

HUANG, Xiao-Jun; YU, An-Guo; XU, Zhi-Kang. Covalent immobilization of lipase from *Candida rugosa* onto poly (acrylonitrile-co-2-hydroxyethyl methacrylate) electrospun fibrous membranes for potential bioreactor application. **Bioresource Technology**. vol.99, p.5459–5465, 2008.

JAEGER, K. E., Eggert, T. Lipases for biotechnology. **Curr. Opin. Biotech**, vol.13, p. 390 – 397. 2002.

JÚNIOR, Américo Cruz. **Imobilização de lipase de *Candida antarctica* B em quitosana para obtenção de biodiesel transesterificação do óleo de mamona**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis – SC, 122p. 2007.

LAUS, Rogério. **Adsorção de Cu(II), Cd(II) e Pb(II) em soluções individuais, binárias e ternárias pela quitosana modificada com epícloridrina/trifosfato**. Tese (Doutorado), Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis – SC, 2011. 124p.

LAUS, Rogério; Laranjeira, Mauro C.M.; Martins, Amarildo O.; Fávere, Valfredo T. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizados para remoção da acidez, ferro(III) e manganês(II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, vol. 29, No. 1, p. 34 – 39, 2006.

LIU, H.; ADHIKARI, R.; GUO, Q.; ADHIKARI, B. Preparation and characterization of glycerol plasticized (high-amylose) starch-chitosan films. **Journal of Food Engineering**, vol. 116, p. 588- 597. 2013.

LIU, T., Wang, Z.L., Zhao, L., Yang, X. Enhanced chitosan/Fe<sup>0</sup>- nanoparticles beads for hexavalent chromium removal from wastewater. **Chemical Engineering Journal** 189 – 190. p. 196- 202, 2012.

LUCAS, E. F., Soares, B. G., Monteiro, E. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica, Rio de Janeiro – RJ: **E-papers**, 366p. 2001.

MARTINS, Paolla Carminatti. **Quitosana como catalisador na transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília – UNB. Brasília – DF, 2008, 63p.

MATTA JUNIOR, Manoel Divino da. **Caracterização de biofilmes obtidos a partir de amido de ervilha (*Pisum sativum*) associado à goma xantana e glicerol**. Dissertação (Mestrado). Escola superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba – SP. 113p. 2009.

MENDES, Adriano Aguiar. **Seleção de suporte e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. São Carlos – SP. 225p. 2009.

MIYAKAWA, W.; OTANI, C. Aplicações da microscopia de força atômica. **Ativ. P&D IEAv**, vol.1, p.121. São José dos Campos – SP. 2008.

MOREIRA, Marcelo Alves. **Utilização de lipases em reações de epoxidação quimio-enzimática**. Dissertação (mestrado). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC. 2003. 74p.

NASCIMENTO, I.V.S.R; LEAL, R.C; FOOK, M.V.L; MEIRA, R.C. Esterilização de membranas de quitosana para utilização como biomaterial – **7° COLAOB – Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**. Natal – RN, 2012.

NASCIMENTO, M. G., Soldi, V., Dalla- Vecchia, R. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.4, n. 27, 2004, p. 623 – 630.

NEAU, S. H., Betigeri, S. Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads. **Biomaterials**, n. 23, 2002, p. 3627 – 3636.

NGAH, W.S.W.; HÁNAFIAH, M.A.K.M; YONG, S.S. Adsorption of humic acid from aqueous solutions on crosslinked chitosan- epichlorohydrin beads: kinetics and isotherm studies. **Colloids and Surfaces: Biointerfaces**, vol. 65, p. 18-24. 2008.

OLIVEIRA, Inês Rosane Welter Zwirtes de. **Desenvolvimento de biossensores e sensores biomiméticos para determinação de compostos fenólicos**. Tese (Doutorado). Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. Florianópolis – SC. 174p. 2007.

REBELO, Lya Pantoja. **Imobilização da lipase Burkholderia cepacia em nanopartículas magnéticas e sua aplicação em resolução cinética de álcoois secundários quirais**. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo – USP. São Paulo – SP. 220p. 2009.

REGIANE, A. M. **Eletrólitos sólidos poliméricos à base de polissacarídeos: síntese e caracterização**. Universidade de São Paulo – USP, Tese (Doutorado). São Paulo – SP. 2000.

RODRIGUES, R. C., Bolivar, J. M. A., Palauorsa, A., Volpato, G., Ayub, M. A. Z., Fernandez-Lafuente, R., Guisan, J. M. A. Positive effects of the multipoint covalente immobilization in the reactivation of partially inactivated derivatives of lipase from thermomyces lanuginous. **Enzyme and Microbial Technology**, v44, p.386-393, 2009.

RODRIGUES, Rafael Costa. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisadas por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre – RS. 183p. 2009.

RORRER, G. L.; Hsien, T. -Y.; Way, J. D.; **Ind. Eng. Chem. Res.** Vol. 32, p. 2170, 1993.

SANTOS, Érica Marques da Silva. **Modificação e caracterização da quitosana para uso como suportes em processos biotecnológicos**. Tese (Doutorado) Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2009, 164p.

SELLIN, N., **Análise da superfície de polímeros pós – tratamento corona.** Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP. 78p.

SILVA, Jame's Almada da. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida Antarctica* tipo B imobilizada para síntese de ésteres de vitamina A.** Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará – UFC. Fortaleza – CE. 97p. 2007.

SILVA, R.C., Junior, M.A.S.A., Cestari, A.R. Adsorção de Cr (VI) em esferas reticuladas de quitosana – novas correlações cinéticas e termodinâmicas utilizando microcalorimetria isoérmica contínua. **Química Nova**, vol. 33, n. 4, p. 880 – 884, 2010.

STAMATIALIS, D.F.; DIAS, C.R.; PINHO, M.N. Atomic force microscopy on dense and asymmetric membranes. **Journal of Membrane Science**. vol.160, p. 235-242. 1999.

TORRES, M.A, Vieira, R.S., Beppu, M.M., Santana, C.C. Produção e caracterização de microesferas de quitosana modificadas quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, n.4, p. 306 – 312, 2005.

TREVISAN, Henrique Celso. **Desenvolvimento de um método de produção de sílica de porosidade controlada e sua utilização na imobilização de proteínas.** Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas - SP. 217p. 1993.

WAN,Y.; WU,H.; YU. A.; WEN, D. Biodegradable polylactide/chitosan blend membranes. **Biomacromolecules**, vol. 7. p. 1362- 1372. 2006.

WANG, Ping. Nanoscale biocatalyst systems. **Current Opinion in Biotechnology**, vol. 17, p. 574 – 579, 2006.

XU, Z., Jiang, J., Ye, P. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan – modified poly(acrylonitrile- co- maleic acid) membrane surface. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 60, 2007, p. 62 – 67.

YASDANI, S.S., Gonzalez, R. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry. **Curr. Opin. Biotechnol.** Vol.18, p. 213 – 219. 2007.

ZIVANOVIC, S.; LI, J.; DAVIDSON, P.M.; KIT, K. Physical mechanical, and antibacterial properties of chitosan/PEO blend films. **Biomocromolecules**, vol.8, p. 1505- 1510. 2007.