

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES COM
NÚCLEO MAGNÉTICO A PARTIR DE POLÍMEROS NATURAIS

ELAINE APARECIDA SANTOS CARVALHO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES / RJ
NOVEMBRO – 2012

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES COM
NÚCLEO MAGNÉTICO A PARTIR DE POLÍMEROS NATURAIS

ELAINE APARECIDA SANTOS CARVALHO

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutor em Engenharia e Ciência de Materiais”.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos
Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
NOVEMBRO – 2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**

11/2013

Carvalho, Elaine Aparecida Santos

Formulação e caracterização de biocatalisadores com núcleo magnético a partir de polímeros naturais / Elaine Aparecida Santos Carvalho. – Campos dos Goytacazes, 2012.

xvi, 118 f. : il.

Tese (Doutorado 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, 2012.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodríguez.

Área de concentração: Polímeros e compósitos.

Bibliografia: f. 111-121.

1. BIOCATALISADORES 2. POLÍMEORS NATURAIS 3. IMOBILIZAÇÃO
4. HIDROFILICIDADE 5. NANOMAGNETITA I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados II. Título.

CDD 547.758

FORMULAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE BIOCATALISADORES COM
NÚCLEO MAGNÉTICO A PARTIR DE POLÍMEROS NATURAIS

ELAINE APARECIDA SANTOS CARVALHO

“Tese de doutorado apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte dos requisitos para a obtenção de título de Doutor em Engenharia e Ciência de Materiais”.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos

Comissão Examinadora:

Prof. Maria Inês Bruno Tavares (Doutor Ciências e Tec. de Polímeros) - UFRJ

Prof. Sérgio Neves Monteiro (Ph. D. Eng. E Ciência dos Materiais) - IME

Dr^a Teresa Eligio Castillo (Doutora, Engenharia e Ciência dos Materiais) – UENF

Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez (D.Sc., Ciências Químicas) – UENF - Orientador

Dedico este trabalho a Deus pelo dom da vida, aos meus pais Daniel e Vera, pelo amor, dedicação, apoio e esforços sempre presentes durante todo o meu crescimento pessoal e profissional, ao meu marido, pelo carinho, amizade, paciência e incentivos constantes para o desenvolvimento deste trabalho, ao meu irmão Edmilson, pelo apoio, carinho e companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não poderia se concretizar sem a contribuição e participação de diversas pessoas, portanto quero expressar meus agradecimentos a todos que de alguma forma me apoiaram.

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para tudo aquilo que Ele me destina.

Ao Professor Rubén Sánchez, meu orientador, pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pela disponibilidade, generosidade e amizade reveladas ao longo destes anos de trabalho, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação. E a sua esposa Teresa, pela amizade, ajuda e pelos momentos de descontração.

Aos meus pais Daniel, Vera e meu irmão Edmilson, minha cunhada Raquel, pela paciência, apoio nos momentos difíceis, pelo amor e carinho sempre concedidos.

Ao meu amor, que no início era meu namorado e hoje meu marido. Por ter suportado comigo todas as dificuldades durante a realização deste trabalho, pelo amor, dedicação e paciência e por ser o meu porto seguro nesta travessia.

As alunas de iniciação científica, Ellen e Mayara, pela amizade, dedicação, compromisso e competência na realização dos experimentos, sem elas não seria possível a realização deste trabalho.

Em especial a um grande amigo, Darlan pela amizade, companheirismo, dedicação e estando sempre disponível a ajudar, por muitas coisas que não caberiam nestas linhas, mas foram imprescindíveis. Obrigada pela amizade.

Ao professor Cláudio e ao técnico Artur do Departamento de Biologia da UENF pela colaboração e pelo laboratório cedido para a realização de parte dos meus experimentos.

Aos colegas de laboratório, Lucivan, Melina, Tiago, Magno pela convivência. Em especial a Emilene, Paula e Camila por ser minha família, dividindo o mesmo teto por esses anos, pelas conversas descontraídas e pelo apoio e principalmente pela amizade que construímos.

Aos professores, Ana Lúcia, Ângelus, Raul, Eduardo Atem e Lioudimila, pela ajuda e por ter disponibilizado equipamentos para realização dos meus experimentos.

Ao professor Sérgio Neves, pela ajuda na realização do MEV na COPPE-UFRJ.

A professora Maria Inês, por sempre estar disponível em responder meus emails e na realização da análise de RMN e ao técnico Eduardo Bastos, no IMA-UFRJ.

Aos amigos, Mario Lucas, Elaine Cristina, Kátia, Myrian, Érica, Luciana, Regina, Leila e Luiz Tatagiba, pela amizade, por muitas vezes terem tempo em me ajudar na realização de análises e pelas conversas no laboratório.

Ao professor Rubem Sommer e os alunos de doutorado Roberta Dutra e Diego, pela grande colaboração na realização das análises de VSM, no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas-CBPF.

A professora Elisa Saitovitch e a aluna de doutorado Isabel, pela grande colaboração na realização das análises de espectrometria mossbauer, no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas-CBPF.

Ao professor Flávio Minguens do CBB, na colaboração na realização do MEV.

Ao professor Luiz Mendes, na colaboração na realização da análise de ângulo de contato.

A técnica Bia, pela sua simpatia e ajuda na realização das análises.

Ao professor e dentista Marco Antônio Gallito, pela indicação para a realização de uma das análises.

Ao professor Djalma, pela amizade e pela sua ajuda fundamental na realização deste trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro, na realização deste trabalho.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações	xii
RESUMO	xiii
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	1
1.1 – OBJETIVO GERAL	3
1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.3 – JUSTIFICATIVAS	3
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	6
2.1 – INTRODUÇÃO	6
2.1.1 – OBTENÇÃO DE BIODIESEL	6
2.2 – SUPORTES POLIMÉRICOS UTILIZADOS NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS	10
2.3 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM SUPORTES POLIMÉRICOS	17
2.3.1 - LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE POLIMÉRICO.....	22
2.4 – SUPORTES POLIMÉRICOS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS COM ENZIMAS IMOBILIZADAS POR LIGAÇÃO COVALENTE	28
2.4.1 – SUPORTES POLIMÉRICOS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS IMOBILIZADO COM ENZIMAS POR LIGAÇÃO COVALENTE NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS.....	35
2.4.2 – CARÁTER HIDROFÓBICO/HIDROFÍLICO DO SUPORTE E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DA ENZIMA	40

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
3.1 – MATERIAIS	44
3.2 – MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO AMCAP	45
3.2.1 – MODIFICAÇÃO POR ENXERTO DO MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO NO AMCAP.....	45
3.2.2 – MODIFICAÇÃO POR ENXERTO DO MONÔMERO ACRILAMIDA NO AMCAP	46
3.3 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL	47
3.3.1 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN).....	47
3.3.2 – TERMOGRAVIMETRIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA	48
3.3.3 – ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	49
3.4 – CRISTALINIDADE E PROPRIEDADES TÉRMICAS DOS POLÍMEROS MODIFICADOS.....	50
3.4.1 – DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	50
3.4.2 – CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC), TRANSIÇÃO VÍTREA	50
3.4.3 – ESTABILIDADE TÉRMICA DOS POLÍMEROS MODIFICADOS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)	51
3.5 – HIDROFILICIDADE DOS SUPORTES POR ÂNGULO DE CONTATO	52
3.6 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA-NÚCLEO	53
3.6.1 – PREPARAÇÃO DA NANO MAGNETITA (NÚCLEO).....	53
3.6.2 – PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE SIMPLES EMULSÃO E COAGULAÇÃO.	54
3.6.2.1 – AMCAP, AMCAP-AAM E AMCAP-AAC	55

3.6.2.2 – QUITOSANA.....	55
3.6.3 – PARTÍCULAS DE AMCAP MODIFICADAS COM ACRILAMIDA.....	56
3.7 – CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS.....	57
3.7.1 – DETERMINAÇÃO DA CARGA DE MAGNETITA POR TERMOGRAVIMETRIA	57
3.7.2 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DAS MICROPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	57
3.7.3 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS PARTÍCULAS.....	58
3.7.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DO FERRO.....	58
3.7.5 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DOS SUPORTES.....	59
3.8 – IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS, POR LIGAÇÃO COVALENTE.....	59
3.8.1 – ATIVAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO.....	59
Figura 40 - Esquema proposto para a modificação das micropartículas com glutaraldeído.....	60
3.8.4 – IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR LIGAÇÃO COVALENTE.....	61
3.8.4.1- DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA.....	61
3.8.4.2 – IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE.....	62
3.9 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA.....	63
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
4.1 - INTRODUÇÃO.....	65
4.2 – MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO AMCAP.....	65
4.2.1 – ENXERTO DO MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO NO AMCAP.....	65
4.2.2 – ENXERTO DA ACRILAMIDA NO AMCAP.....	66

4.3 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)	68
4.4 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO AMCAP MODIFICADO	70
4.4.2 - TERMOGRAVIMETRIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (TGA/MS).....	76
4.4.3 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DOS POLÍMEROS AMCAP, AMCAP-AAC, AMCAP-AAM E QUITOSANA	78
4.5 – PROPRIEDADES DOS POLÍMEROS UTILIZADOS COMO SUPORTES	80
4.5.1 - CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC).....	80
4.5.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA DOS SUPORTES POLÍMEROS	81
4.5.3 – ÂNGULO DE CONTATO	85
4.6 – CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS	86
4.6.1 - MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS DE SUPORTE.....	86
4.7.2 – DETERMINAÇÃO DA CARGA MAGNÉTICA (Fe ₃ O ₄) NOS SUPORTES POLIMÉRICOS	91
4.7.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS NÚCLEOS MAGNÉTICOS POR ESPECTROSCOPIA MOSSBAUER	94
4.7.4 - PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DOS SUPORTES POLIMÉRICOS.....	96
4.8 - ATIVAÇÃO DOS SUPORTES MAGNÉTICOS COM GLUTRALDEÍDO	99
4.9 – ATIVIDADE CATALÍTICA.....	102
4.9.1 – CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA, MÉTODO DE BRADFORD E ATIVIDADE HIDROLÍTICA.	102
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	105
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS.....	108

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema resumida da síntese de mono alquil éster (biodiesel) (Furigo et. Al., 2009).....	1
Figura 2 - Resumo esquemático da geração de glicerol e suas rotas alternativas. (Leoneti et. al., 2012).....	4
Figura 3 - Tipos de reator: (a) reator de mistura; (b) reator de leito empacotado e (c) reator de leito fluidizado. (Canilha et. al., 2006).....	9
Figura 4 - (A) Enzima imobilizada Pura, (B) Enzima imobilizada antes da purificação. (Alves et. al., 2005).....	11
Figura 5 - (C) Enzima purificada com 2-propanol, (D) Enzima purificada com Água/acetona.....	11
Figura 6 – Carregamento e atividade das lípases comerciais imobilizadas em polipropileno macroporoso. (Salis et. al., 2008).....	12
Figura 7 – Rastreia das lípases imobilizadas em polipropileno macroporoso para a síntese de biodiesel, óleo de soja e metanol a 40°C . Lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i> AK (Δ); <i>Pseudomonas Cepacia</i> PS (O) e outras lípases (\square). (Salis et. al., 2008).....	13
Figura 8 – Variação da eficiência da produção de biodiesel com o tempo para o óleo de girassol, soja e o óleo de cozinha desperdiçado (condições de operação: substrato 21mL/min, temperatura 65°C, reação total 5h) (Keskinler et. al., 2009).....	14
Figura 9 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada em copolímero STY-DVB (O) E copolímero STY-DVB-PGA (\bullet). (Keskinler et. al., 2009).....	15
Figura 10 – Atividade hidrolítica em função da concentração (óleo de milho). (Pereira et. al., 2010).....	16
Figura 11 – Atividade hidrolítica em função da concentração (óleo de girassol). (Pereira et. al., 2010).....	16
Figura 12 - Tipos de imobilização de enzimas. (Nascimento et. al., 2004).....	19

Figura 13 - Efeito da temperatura e da atividade da enzima livre e imobilizada pH 8,0, 40°C (●), 50°C(▲), 60°C(■), enzima livre (----) e imobilizada (–). (Devi et. al., 2006).....	24
Figura 14 - Efeito da razão molar na conversão de alçóólises produzido usando enzima livre (■) e imobilizada (■). (Devi et. al., 2006).....	25
Figura 15 - Esferas de quitosana imobilizadas com CALB L com glutaraldeído 3%. (Júnior, 2007).....	26
Figura 16 - Conversão de ésteres versus número de ciclos da enzima imobilizada nas esferas de quitosana ativadas com solução de glutaraldeído 3% (v/v). (Júnior, 2007).....	26
Figura 17 - Efeito da temperatura na atividade da enzima livre (▲) e imobilizada (■). (Cetinus et. al., 2007).....	27
Figura 18 - Reutilização da enzima imobilizada a 40°C. (Cetinus et. al., 2007).....	28
Figura 19 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microesferas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído (Huang et. al., 2005).....	29
Figura 20 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microesferas magnéticas da quitosana (Huang et. al., 2005).....	30
Figura 21 – Efeito da concentração de glutaraldeído na imobilização da enzima (Huang et. al., 2005).....	30
Figura 22 - Magnetização contra campo magnético de nanopartículas (a) Fe ₃ O ₄ , (b) Fe ₃ O ₄ -CS. (Hasirci et. al., 2011).....	31
Figura 23 – Imagens do MET das nanopartículas de CS-Fe ₃ O ₄ (escala de 20nm). (Hasirci et. al., 2011).....	32
Figura 24 - Efeito do número de atividades de reutilização da enzima imobilizada. (Hasirci et. al., 2011).....	33

Figura 25 - Ciclo de histerese magnética de esferas de quitosana magnética. (Zhang et. al., 2009).....	34
Figura 26 - (a) Estabilidade térmica e (b) e de operação de pululanase imobilizada. (Zhang et. al., 2009).....	34
Figura 27 - Efeito de várias quantidades de lipase imobilizada em transesterificação enzimática de óleo de soja. (Xie et. al., 2012).....	35
Figura 28 – Micrografias do MET das nanopartículas de CS-Fe ₃ O ₄ . (Xie et. al., 2012).....	36
Figura 29 - Curvas de magnetização para (a) Fe ₃ O ₄ , (b) Fe ₃ O ₄ com microesferas de quitosana imobilizada com lipase. (Xie et. al., 2012).....	37
Figura 30 - Efeito da temperatura da reação enzimática na transesterificação de óleo de soja. (Xie et. al., 2012).....	37
Figura 31 - Microcápsulas de Q/Fe ₃ O ₄ (a) concentração 2% e (b) concentração 3%. (Santos, 2009).....	38
Figura 32 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/Fe ₃ O ₄ (Santos, 2009).....	39
Figura 33 - Microcápsulas de Q/Fe ₃ O ₄ após a imobilização de enzimas. (Santos, 2009).....	40
Figura 34 - Diferentes estruturas da superfície de polímeros magnéticos (Zhang et. al., 2012).....	41
Figura 35 – Efeito da hidrofobicidade/hidrofilicidade de microesferas magnéticas imobilizadas (Zhang et. al., 2012).....	42
Figura 36 – Esquema da imobilização da lipase com suporte com moderada hidrofobicidade/hidrofilicidade (Zhang et. al., 2012).....	43
Figura 37 – Reator IKA-250 existente no setor de polímeros do LAMAV.....	46
Figura 38 – Método da gota séssil: medida dos ângulos de (a) avanço e (b) retrocesso (Sellin, 2002).....	52

Figura 39 - Esquema da técnica de coagulação.....	56
Figura 40 - Esquema proposto para a modificação das micropartículas com glutaraldeído.....	60
Figura 41 - Modificação do AMCAP por enxertia do ácido acrílico.....	66
Figura 42 – Reação do PSA para gerar o radical ânion sulfato. (Baltieri, 1996).....	66
Figura 43 – Formação do centro ativo na acrilamida.....	67
Figura 44 - Esquema da estrutura possível do polímero AMCAP modificado com o monômero acrilamida.....	67
Figura 45 - Espectros de FTIV do AMCAP e do AMCAP-AAc.....	68
Figura 46 - Espectros de FTIV do AMCAP e do AMCAP-AAm.....	69
Figura 47 – Estrutura do (acrilamidometil) acetato propionato de celulose (AMCAP).....	70
Figura 48 - Espectro do RMN- ¹³ C do AMCAP de partida.....	71
Figura 49 - Simulação do espectro RMN- ¹³ C do AMCAP de partida.....	71
Figura 50 - Espectro do RMN- ¹³ C do AMCAP modificado com o monômero ácido acrílico (AMCAP-AAc).....	72
Figura 51 – Estrutura do AMCAP modificado com o ácido acrílico (AMCAP-AAc).....	73
Figura 52 - Simulação do espectro RMN- ¹³ C do AMCAP-AAc.....	73
Figura 53 – Possível estrutura do AMCAP modificado com o monômero acrilamida (AMCAP-AAm).....	74
Figura 54 - Espectro de RMN de ¹³ C em solução do AMCAP modificado com o monômero acrilamida (AMCAP-AAm).....	75
Figura 55 - Simulação do espectro RMN- ¹³ C do AMCAP-AAm modificado.....	76
Figura 56 - Espectro de massa do AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm.....	77

Figura 57 - Difratoograma de raio-X do AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm.....	79
Figura 58 - Difratoograma de raio-X da quitosana.....	79
Figura 59 - Curvas de DSC do AMCAP de partida e dos AMCAP modificado com os monômeros AAC e AAM.....	81
Figura 60 – Curva termogravimétrica do AMCAP de partida e dos modificados em atmosfera de nitrogênio.....	82
Figura 61 – Curva termogravimétrica do AMCAP de partida e dos modificados em atmosfera de ar.....	83
Figura 62 – Curva termogravimétrica da Quitosana em atmosfera de ar e nitrogênio.....	83
Figura 63 - Micrografia eletrônica de varredura do AMCAP/Fe ₃ O ₄ , AMCAP-AAc/ Fe ₃ O ₄ e AMCA-AAm/ Fe ₃ O ₄ (a, d e g), micrografia ótica (b, e e h) e gráfico da distribuição das micropartículas (c,f e i).....	87
Figura 64 - Micrografia ótica (a), micrografia eletrônica de varredura (b) e gráfico da distribuição das micropartículas de Quitosana/Fe ₃ O ₄ (c).....	88
Figura 65 - Micrografia eletrônica de varredura da superfície das micropartículas de AMCAP/ Fe ₃ O ₄ (a); AMCAP-AAc/Fe ₃ O ₄ (c); AMCAP-Am/ Fe ₃ O ₄ (e) e Quitosana/ Fe ₃ O ₄ (g) aumento de 5000x e das micropartículas de AMCAP/ Fe ₃ O ₄ (b); AMCAP-AAc/Fe ₃ O ₄ (d); AMCAP-AAm/ Fe ₃ O ₄ (f) e Quitosana/ Fe ₃ O ₄ (h) aumento de 80x.....	90
Figura 66 - Curvas termogravimétricas da Fe ₃ O ₄ em atmosfera de ar e nitrogênio.....	91
Figura 67 – Curvas termogravimétricas do polímero AMCAP e das microcápsulas magnéticas AMCAP.....	92
Figura 68 – Curvas termogravimétricas do polímero AMCAP-AAc e das microcápsulas magnéticas de AMCAP-AAc.....	92
Figura 69 – Curvas termogravimétricas do polímero AMCAP-AAm e das microcápsulas magnéticas AMCAP-AAm.....	93

Figura 70 – Curvas termogravimétricas do AMCAP e das microcápsulas magnéticas de AMCAP-modif-AAm.....	93
Figura 71 – Curva termogravimétrica da quitosana e das microcápsulas magnéticas de quitosana.....	94
Figura 72 - Espectro mössbauer das micropartículas de CS/Fe ₃ O ₄	95
Figura 73 - Curva de magnetização para a magnetita (a) e magnetita atraída pelo imã (b).....	96
Figura 74 - Curva de magnetização das micropartículas de AMCAP/Fe ₃ O ₄	97
Figura 75 - Curva de magnetização das micropartículas de AMCAP-AAc/Fe ₃ O ₄	97
Figura 76 - Curva de magnetização das micropartículas de AMCAP-AAm/Fe ₃ O ₄	98
Figura 77 - Curva de magnetização das micropartículas de CS/Fe ₃ O ₄	98
Figura 78 - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 3 horas.....	100
Figura 79 - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 5 horas.....	101
Figura 80 - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 6 horas.....	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de catalisadores homogêneos básicos e ácidos. (Albuquerque, 2010).....	7
Tabela 2 - Vantagens e desvantagens de catalisadores heterogêneos básicos e ácidos. (Albuquerque, 2010).....	8
Tabela 3 - Trabalhos reportados da literatura no período de 1997-2012.....	19
Tabela 4 - Temperatura máxima de degradação térmica dos polímeros, quitosana, AMCAP e dos modificados.....	84
Tabela 5 – Medidas de ângulo de contato dos polímeros de origem celulósico e da quitosana.....	86
Tabela 6 – Distribuição de tamanhos de micropartículas dos diferentes suportes.....	89
Tabela 7 - Magnetização de saturação dos diferentes suportes.....	99
Tabela 8 – Parâmetros para a determinação da enzima lípase AK.....	103
Tabela 9 - Valores da atividade hidrolítica dos suportes imobilizado.....	104

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações

CS – Quitosana

AMCAP – Acrilamidometil acetato propionato de celulose

AAm – Acrilamida

AAc – Ácido acrílico

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

N₂ – Nitrogênio

PSA – Persulfato de amônia

AMCA - Acrilamidometil acetato de celulose

RMN – Ressonância magnética nuclear

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

DSC – Calorimetria diferencial exploratória

TGA – Análise termogravimétrica

DTG – Termogravimetria derivativa

FeSO₄.7H₂O – Sulfato ferroso P.A.

FeCl₃.6H₂O – Cloreto de ferro III (ICO) hexahidratado P.A.

Fe₃O₄ – Magnetita

NaOH – Hidróxido de sódio

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NH₂ – Amia primária

KBr – Brometo de potássio

PEG – Polietilenoglicol

GA – Glutaraldeído

BSA – Albumina de soro bovino

RESUMO

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento sustentável e economicamente viável o setor biotecnológico no Brasil tem um espaço de particular importância na produção de biodiesel. Em este contexto o estudo de novos biocatalisadores com propriedades magnéticas numa matriz polimérica de origem natural como suporte de enzimas para a produção de biodiesel em reatores assistidos por campo magnético é uma das áreas de interesse possibilitando processos mais eficientes e econômicos que os processos clássicos nos quais os biocatalisadores estão submetidos a condições de atrito e pressão que diminuem sua vida útil.

O presente trabalho tem como objetivo geral, a modificação e caracterização de um derivado da celulose (AMCAP), com a introdução da técnica de enxerto de dois monômeros (ácido acrílico (AAc) e acrilamida (AAm)) que como a quitosana são utilizados na formulação de biocatalisadores.

As modificações foram acompanhadas utilizando as técnicas de caracterização estrutural ressonância magnética nuclear (RMN), espectrometria de massa e espectroscopia de infravermelho com transformada de fourier (FITV) assim como as técnicas de difração de raios-x, calorimetria diferencial exploratória (DSC), termogravimetria (TGA) e ângulo de contato. Os resultados indicaram o impacto das modificações na mobilidade conformacional das cadeias poliméricas assim como as mudanças no grau de hidrofiliidade das superfícies.

As micropartículas formuladas foram caracterizadas através das técnicas de microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia Mössbauer e de magnetização. As micropartículas poliméricas (AMCAP, AMCAP-AAc, AMCAP-AAm e Quitosana) apresentaram uma distribuição de tamanho regular, formato esférico e propriedades superparamagnéticas associadas ao núcleo de magnetita. As propriedades apresentadas resultam favoráveis para a utilização pretendida considerando a possibilidade de controlar dentro do reator a distribuição das partículas magnéticas no leito fluidizado assistido

magneticamente assim como as possibilidades de operar no reator com fluxos maiores e a fácil recuperação do biocatalisador.

Foi realizada a imobilizada de forma covalente da Lipase comercial obtida a partir da *Pseudomonas fluorescens* (Lípase AK) em todas as microcapsulas formuladas, sendo previamente ativados com glutaraldeido os suportes AMCAP-AAm e Quitosana. Ensaios de atividade para avaliar, de forma preliminar, como influencia o balanço hidrofóbico/hidrofílico da superfície dos suportes na atividade catalítica da Lipase foram realizados utilizando uma emulsão de azeite de oliva. Nas condições que os ensaios foram realizados não foi detectada diferenças na atividade das enzimas imobilizadas.

Among the perspective for the sustentable and economically viable development, the biotechnology sector in Brazil has a important particular site on the biodiesel production. In this context, the study of new biocatalysts with magnetic properties in the natural polymeric matrix as enzymes supports to produce biodiesel inside an assisted reactor by magnetic field is one of the areas of interest that enable more efficient and economic processes than the classic one whose biocatalysts are subject to friction and pressure conditions, which make the useful life decrease.

This work aims to modify and characterize a cellulose derivative, named AMCAP, by introducing two monomers (acrylic acid (AAc) and acrylamide (AAM)), by the technique of grafting, which are used in the biocatalysts formulation with the chitosan.

The changes were monitored using the structural characterization Nuclear Magnetic Resonance (NMR), mass spectrometry and infrared spectroscopy with fourier transform (FITV) as well as the x-ray difraction technique, differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetric (TGA) and contact angle. The results indicated the impact of changes in conformational mobility of the polymeric chains as well as changes in the degree of hydrophilicity of surfaces.

The formulated microparticles were characterized with the scanning electron microscopy technique, Mössbauer and magnetization spectroscopy. The polymeric microparticles (AMCAP, AMCAP-AAc, AMCAP-AAM and chitosan) presented a regular size distribution, spherical shape and super paramagnetic properties associated with the magnetite core. These properties result in favorable conditions for the desired use, considering the possibility of control the particle distribution inside the reactor on the magnetically assisted fluidized bed as well as the possibility to operate the highest flows and the easy recuperation of the biocatalysts on the reactor.

The immobilization was performed covalently of the commercial lipase, which was obtained from the fluorescent *Pseudomonas* (AK lipase) in all formulated microcapsules previously activated with the glutaraldehyde AMCAP-AAm supports and chitosan.

In a preliminary way, activity assays were performed, using an emulsion of olive oil, to assess how the hydrophobic/hydrophilic balance of the support surface can influence the catalytic activity of the lipase. Under the conditions that the tests were conducted, differences between the immobilized enzymes activity was not detected.

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Existe uma crescente preocupação a respeito do meio ambiente causado pelos combustíveis fósseis e a disponibilidade desses recursos naturais não renováveis. Em este contexto se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, e o impacto ambiental das tecnologias atuais no aquecimento do planeta (Gonçalves *et. al.*, 2005).

O biodiesel surge como sendo uma fonte de energia renovável alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, já que sua utilização aumenta a segurança energética e diminui a poluição do ar além de ser produzido utilizando uma tecnologia sustentável. (Furigo, 2009)

O biodiesel é um mono alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais que apresenta um potencial energético, propriedades físicas e químicas semelhantes ao óleo diesel convencional. Para se produzir o biodiesel, o óleo pode ser retirado de plantas ou animais o qual virá a reagir com etanol (ou metanol) em presença de um catalisador (Figura 1).

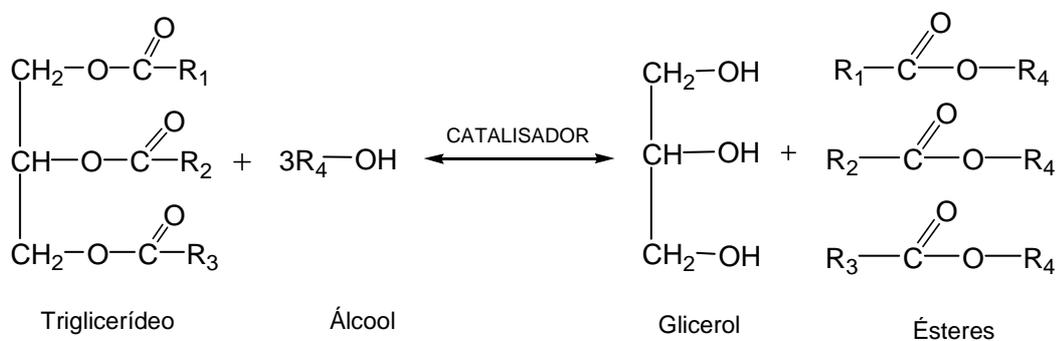


Figura 1 – Esquema resumida da síntese de mono alquil éster (biodiesel) (Furigo *et. al.*, 2009).

O estudo da viabilidade econômica de produção deste biocombustível gera a necessidade de desenvolver biocatalisadores eficientes e de menor custo (Dabdoub *et. al.*, 2009).

Atualmente a catálise enzimática é o principal foco de pesquisas direcionadas à seleção de suportes que permitam uma imobilização eficiente das enzimas ou células (como alternativa de menor custo) centralizando a atenção na estrutura e superfície do suporte (Mendes *et. al.*, 2011), assim como nas condições de imobilização das enzimas, procurando formular um biocatalisador que aumente a estabilidade da enzima e sua atividade catalítica em relação a sua forma livre. (Zhang *et. al.*, 2012)

Os suportes de natureza orgânicos (polímeros) que podem ser naturais ou sintéticos é a classe de suportes de maior perspectiva, dada a flexibilidade de suas estruturas que poderão vir a contribuir com a estabilidade e atividade das enzimas imobilizadas. (Mendes *et. al.*, 2011)

Sob este aspecto um dos desafios da pesquisa do presente trabalho foi o estudo do efeito da funcionalidade superficial de derivados da celulose no processo de imobilização da Lipase AK e na atividade desta enzima imobilizada.

Outro propósito é a utilização de processos mais eficientes e econômicos que os processos clássicos tais como o leito fluidizado nos quais os biocatalisadores estão submetidos a condições de atrito e pressão que diminuem sua vida útil.

Nesta direção a utilização de leitos com propriedades magnéticas (biocatalisadores com núcleos magnéticos) assistidos por um campo magnético aplicado externamente permite controlar o movimento das partículas magnéticas sólidas (Hristov e Fachikov, 2007) o que origina uma maior preservação do suporte, menor queda de pressão no leito, maior facilidade de transporte, aumento das velocidades do fluido (Tuzmen *et. al.*, 2010) e a posterior recuperação do biocatalisador do meio de reação (Philippova *et. al.*, 2011).

1.1 – OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral, a modificação e caracterização de polímeros naturais a serem utilizados como suportes com propriedades magnéticas de enzima imobilizada valorizando o uso de biocatalisadores como parte de uma estratégia de desenvolvimento sustentável.

1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificação e caracterização de derivados de polímeros naturais tais como Acrilamidometil acetato propionato de celulose (AMCAP) e Quitosana (CS).
- Síntese e estabilização de nano magnetita (Fe_3O_4 , magnetita), para sua utilização como núcleo magnético em suportes de enzimas.
- Formulação e caracterização de suportes magnéticos a partir de derivados da celulose e quitosana com morfologia casca/núcleo.
- Imobilização da Lipase e avaliação da atividade catalítica a temperatura de 25⁰C.
- Estabelecimento de uma correlação entre as modificações estruturais dos suportes estudados e a atividade hidrolítica da lipase imobilizada covalentemente.

1.3 – JUSTIFICATIVAS

A Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) tem os grupos de pesquisas “Polímeros a partir de Recursos Renováveis” (CCT) e “Biomagnetismo Aplicado à Engenharia de Processos da Indústria de Alimentos”, (CCTA) que em colaboração com o grupo do Prof. Rubem Sommer (CBPF) abordam de forma multidisciplinar o desenvolvimento e caracterização de biocatalisadores assim como o estabelecimento de condições favoráveis para a produção de biodiesel como uma fonte de energia ambientalmente favorável.

O biodiesel é uma fonte de energia renovável de particular relevância para o Brasil no que há uma enorme variedade de oleaginosas, principalmente nos solos menos produtivos, com um baixo custo de produção.

O uso do biodiesel como combustível ou adicionado ao combustível convencional proporciona ganho ambiental dada à baixa emissão de partículas de carvão. O biodiesel é um éster que na queima ocorre à combustão completa gerando CO_2 que poderá ser absorvido pelas plantas. (Mendes, 2009) Contribui ainda para a geração de empregos no setor primário, que no Brasil é de suma importância para o desenvolvimento. Com isso, o trabalhador permanece no campo, reduzindo a superlotação para as grandes cidades e favorecendo o ciclo da economia auto-sustentável essencial para a autonomia do país. (Mendes, 2009)

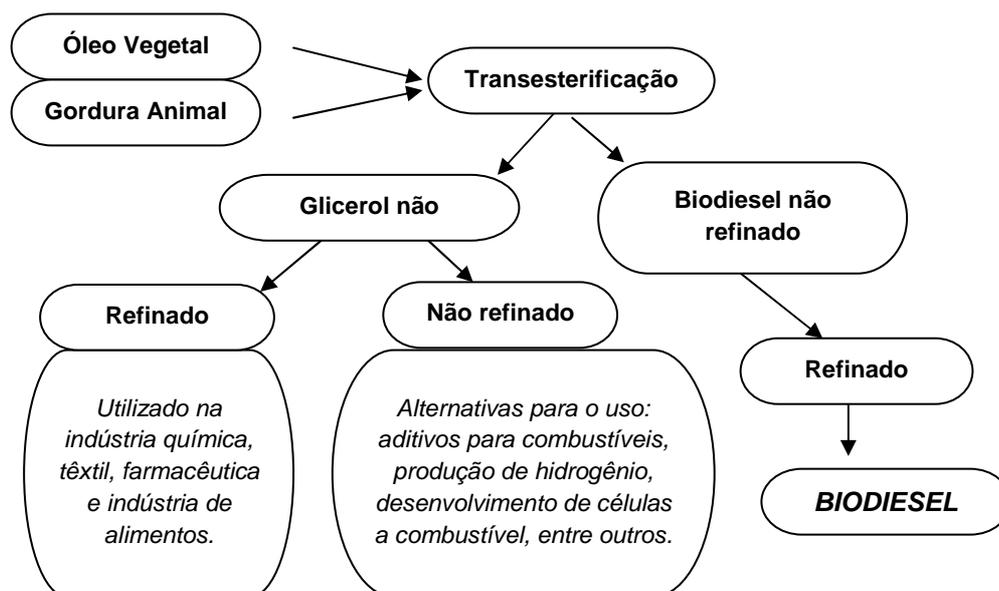


Figura 2 - Resumo esquemático da geração de glicerol e suas rotas alternativas. (Leoneti *et. al.*, 2012).

Tem sido discutido que o aumento da produção de biodiesel gera um acúmulo do denominado subproduto, glicerina, que em 2009 para uma produção total mundial de cerca de 15 bilhões de litros em 2009, gerou um excedente de 260 mil ton de glicerina e em 2010 esse excedente foi de 325 mil ton de glicerina. Na atualidade a produção de glicerina não tem por que gerar um excedente considerando as alternativas (figura 2) existentes de mercado (Queiros *et. al.*, 2012).

Yebo e seus colaboradores (2011) têm mostrado o potencial de utilização da glicerina bruta como uma alternativa ao petróleo para a produção de espuma de poliuretano assim como Ashby (2012) tem utilizado a glicerina como co-substrato para a síntese fermentativa de poli-hidroxialcanoatos de cadeia curta. Todas estas alternativas de utilização do glicerol não refinado gerado na produção do biodiesel sustentam economicamente a viabilidade dos biocombustíveis no mercado brasileiro e no mundo. (Leoneti *et. al.*, 2012)

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – INTRODUÇÃO

2.1.1 – OBTENÇÃO DE BIODIESEL

Atualmente o biodiesel é essencialmente produzido a partir do óleo retirado das plantas e animais por um processo de transesterificação, envolvendo metanol ou etanol. A transesterificação é o processo tecnicamente mais eficiente e mais viável para a produção de biodiesel em larga escala, com minimização de subprodutos desde que as matérias-primas mantenham um nível mínimo de qualidade.

A reação de transesterificação pode ser catalisada por catalisadores homogêneos e heterogêneos. Os catalisadores homogêneos incluem básicos e ácidos. Os catalisadores básicos mais usados são hidróxido de sódio, metóxido de sódio e hidróxido de potássio. Ácido sulfúrico e ácido clorídrico é geralmente preferido como catalisadores ácidos, os catalisadores heterogêneos incluem enzimas, a tabela 1 mostra os principais catalisadores.

Os catalisadores básicos são geralmente os mais comuns, pois o processo é mais rápido e as condições de reação são moderadas. No entanto, sua utilização na transesterificação de óleos vegetais produz reações indesejáveis que consomem parcialmente o catalisador, diminui o rendimento e dificulta a separação e purificação do biodiesel. (Aracil *et. al.*, 2004)

Para eliminar as dificuldades encontradas com a utilização dos catalisadores homogêneos, nos processos de separação biodiesel/catalisador, é utilizada como alternativa os catalisadores sólidos, daí designar-se por catálise heterogênea, a tabela 2 mostra os principais catalisadores. Por outro lado, esta solução alternativa de produção de biodiesel permitiu aumentar a rentabilidade do processo produtivo, tornando-o mais competitivo. Neste aspecto, a utilização de sistemas catalíticos heterogêneo para a

transesterificação dos triglicerídeos em biodiesel implica a eliminação de diversos processos de lavagem/recuperação do catalisador e do próprio biodiesel, permitindo assegurar uma maior eficiência e rentabilidade do processo, baixando os seus custos de produção, havendo ainda a possibilidade de poder ser executado em regime de funcionamento contínuo processual. (Bordado *et. al.*, 2008)

Tabela 1 - Vantagens e desvantagens de catalisadores homogêneos básicos e ácidos. (Albuquerque, 2010)

TIPO	EXEMPLO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Homogêneo básico	NaOH, KOH	Alta atividade catalítica, baixo custo, condições brandas de operação.	Purificação da matéria-prima, formação de emulsões, geração de efluentes para purificação do produto,
Homogêneo ácido	Ácido sulfúrico concentrado	Catalisa simultaneamente a esterificação e transesterificação, não forma sabões.	Corrosão dos equipamentos, dificuldade para reciclagem, baixa atividade catalítica

Novas abordagens do processo de catálise heterogênea tem sido foco de estudo a fim de se obter catalisadores mais específicos. A utilização de enzimas compatíveis com solventes orgânicos a relativas altas temperaturas está se tornando mais disponíveis, o que tem proporcionado que as indústrias utilizem a biocatálise como uma alternativa técnica em comparação com outros catalisadores. (Conti *et. al.*, 2001)

Entretanto a utilização da catálise enzimática tem sido preocupação com os custos do processo, o que tem originado a necessidade de desenvolver sistemas catalíticos que preservem e facilitem a recuperação das enzimas,

assim como processos mais eficientes utilizando reatores que permitem maiores fluxos e melhor contato entre o substrato e o catalisador.

Tabela 2 - Vantagens e desvantagens de catalisadores heterogêneos básicos e ácidos. (Albuquerque, 2010)

TIPO	EXEMPLO	VANTAGENS	DESVANTAGENS
Heterogêneo básico	CaO, CaTiO ₃ , CaZrO ₃ , CaO–CeO ₂ , CaMnO ₃	Não-corrosivo, reciclável, fácil separação, alta seletividade e estabilidade.	Purificação da matéria-prima, temperatura e pressão elevadas, alto custo, limitações de difusões
Heterogêneo ácido	ZnO/I ₂ , ZrO ₂ /SO ₄ , TiO ₂ /SO ₄ 4, Nafion-NR50, nióbio ácido.	Catalisa esterificação e transesterificação simultaneamente, reciclável.	Baixa microporosidade, limitações de difusões, alto custo.

Em termos gerais os reatores utilizados na catálise heterogênea são divididos em 3 categorias (Figura 3): (a) reator de mistura; (b) reator de leito empacotado e (c) reator de leito fluidizado. A desvantagem do reator de mistura é a tensão de cisalhamento imposta à matriz sensível, no reator de leito empacotado os agregados imobilizados são empacotados em uma coluna, através da qual o meio fermentativo é passado. A desvantagem é o desvio do comportamento ideal do fluxo, levando à formação de caminhos preferenciais, o que prejudica as taxas de produção através de limitações à transferência de massa. (Canilha *et. al.*, 2006)

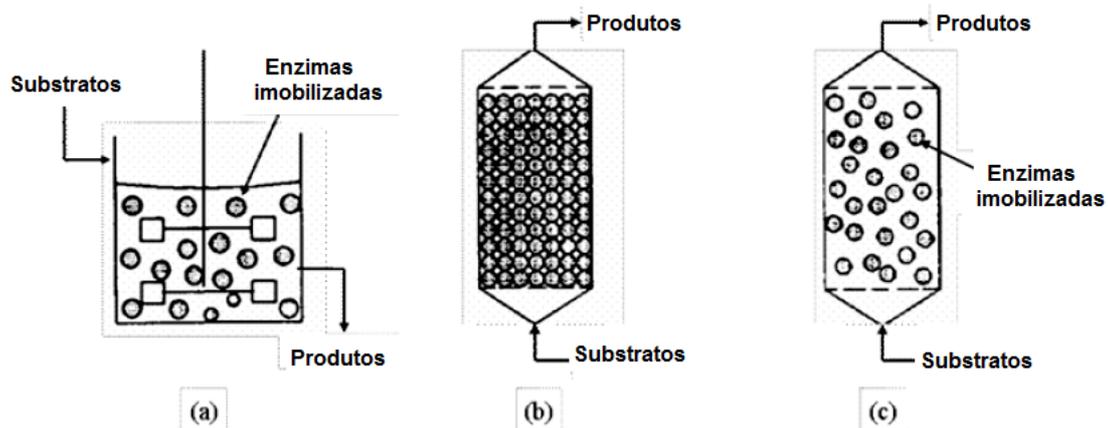


Figura 3 - Tipos de reator: (a) reator de mistura; (b) reator de leito empacotado e (c) reator de leito fluidizado. (Canilha *et. al.*, 2006)

Os reatores de leito fluidizado incorporam as características positivas dos reatores e mantém boas condições de mistura e de leito empacotado tais como baixa tensão de cisalhamento e facilita a mistura entre as fases líquida e sólida. (Canilha *et. al.*, 2006) Ainda com estas vantagens apresentam limitações relativas ao fluxo sua estabilização e exigem do catalisador resistência ao atrito.

Fluidização assistida magneticamente surge como a técnica que preserva as características do leito fluidizado clássico associado com um campo magnético aplicado externamente que controla a distribuição das partículas de biocatalisadores no reator, impedindo o empacotamento do leito e preserva a queda de pressão no leito, além de facilitar o transporte de massa e assim permitir o aumento da velocidade do fluxo. (Hristov e Fachikov, 2007)

Neste contexto, a perspectiva de obtenção de biodiesel desde o ponto de vista econômico e ambiental, com o desenvolvimento de suportes enzimáticos com propriedades magnéticas para utilização de leitos fluidizados assistido por campo magnético.

2.2 – SUPORTES POLIMÉRICOS UTILIZADOS NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS PARA A PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

As características da matriz são de importância primordial na determinação do desempenho da enzima imobilizada para a produção de biodiesel. Os requisitos básicos para um material ser considerado um suporte adequado são: a) as características físicas do suporte devem ser adequadas para uso no reator selecionado; b) manter a estabilidade química e mecânica sob as condições operacionais; c) conter grupos químicos capazes de se ligarem ao biocatalisador; d) porosidade compatível com as dimensões do biocatalisador a ser imobilizado; e) estabilidade térmica. (Vitolo, 2011)

Os suportes podem ser classificados como inorgânicos e orgânicos, sendo os orgânicos subdivididos em natural e sintético. Apesar das muitas vantagens dos suportes inorgânicos, por exemplo, elevada estabilidade física e química contra a degradação microbológica, maior parte das aplicações industriais são realizadas com matrizes orgânicas, principalmente com polímeros naturais utilizados com suportes para imobilização de enzimas para a produção de biodiesel. Devido seu caráter hidrofílico e hidrofóbico e biodegradável. (Brena e Batista-Viera, 2006)

Alves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo sobre a reutilização de lipase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. A lipase tipo CAL-B Cândida Antártica é imobilizada por adsorção sobre um suporte de resina acrílica macroporosa. Testaram-se dois métodos de purificação da enzima o primeiro através da lavagem com água/acetona e o segundo com 2-butanol, as enzimas foram reutilizadas em outras reações para verificar a perda da atividade e seu grau de contaminação.

Nas figuras 4 e 5 são imagens do biocatalizador obtidas através de microscópio, a figura A mostra o estado da enzima antes do processo de transesterificação e a B logo após a filtração sem purificação, onde se observa a possível impregnação de glicerina no suporte. Na figura 5 as imagens C e D são do biocatalisador após purificação, pode-se observar a diminuição da quantidade de glicerina na superfície do mesmo. Observa-se também que a

integridade do suporte polimérico onde está imobilizada a enzima foi mantida apesar de se ter utilizado um reator com agitação magnética para promover a mistura do meio

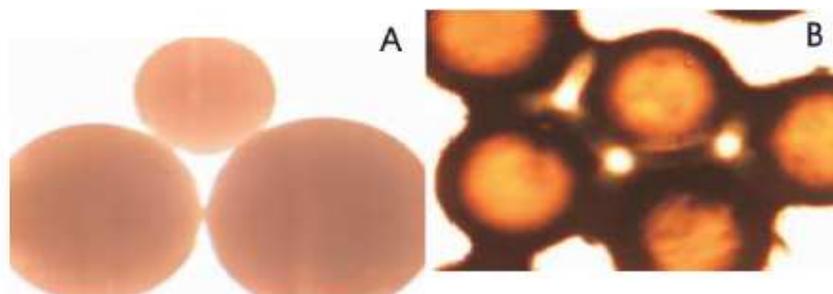


Figura 4 - (A) Enzima imobilizada Pura, (B) Enzima imobilizada antes da purificação. (Alves *et. al.*, 2005)

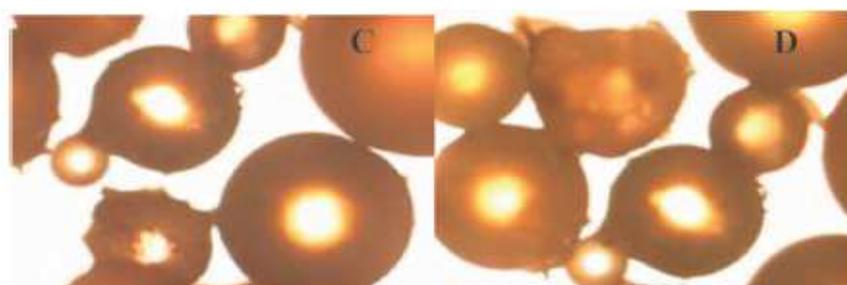


Figura 5 - (C) Enzima purificada com 2-propanol, (D) Enzima purificada com Água/acetona. (Alves *et. al.*, 2005)

A produção de biodiesel utilizando-se enzima imobilizada mostrou-se eficaz apresentando bons rendimentos podendo ser uma rota alternativa ao sistema tradicional de produção utilizando catalisadores homogêneos básicos. A enzima não apresentou grande perda de atividade podendo ser utilizada em diversos ciclos de produção.

O solvente utilizado na lavagem do suporte entre os ciclos de produção tem influência na atividade da enzima. Observou-se que o solvente 2- butanol tem efeito menos deletério à enzima que o sistema água/acetona.

Salis e seus colaboradores (2008) realizaram um trabalho que se destina a investigar o pó de polipropileno macroporoso, um suporte altamente hidrofóbico e amplamente utilizado para a imobilização da lipase, para adaptar um biocatalisador imobilizado durante a síntese de biodiesel. A primeira parte do estudo trata da caracterização e da imobilização por adsorção de oito

lípases comerciais em polipropileno macroporoso, a última parte trata do uso da melhor lipase imobilizada para a síntese de biodiesel.

A figura 6 reporta o carregamento de oito lípases comerciais. Pode-se observar que quanto maior for a carga mais elevada a atividade, mas o processo de imobilização pode levar à inativação de uma certa fração de moléculas de enzima. Isto pode ser devido a uma distorção da estrutura terciária da enzima causada pela interação enzima-suporte que conduz a um rearranjo estrutural.

Além disto, a lipase pode desempenhar um papel, na verdade, devido a natureza hidrofóbica do suporte, é provável que certa fração de moléculas de lipase interajisse com o suporte através da superfície hidrofóbica ao redor do sítio ativo. Isto pode dificultar o substrato chegando ao sítio ativo. No entanto esta interação com uma superfície hidrofóbica deve estabilizar a enzima na conformação ativa. Todos esses efeitos do suporte podem afetar a um ponto diferente a cada lipase imobilizada.

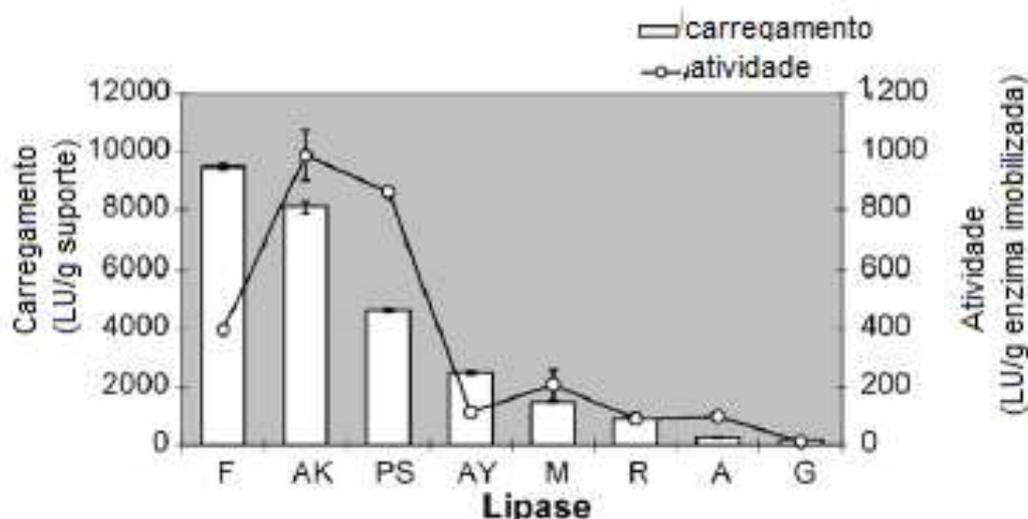


Figura 6 – Carregamento e atividade das lípases comerciais imobilizadas em polipropileno macroporoso. (Salis *et. al.*, 2008)

A figura 7 mostra que seis das oito lípases não apresentaram qualquer atividade, apenas a lipase AK e a PS. Não significa que as outras lípases são

inativas, mas seu comportamento a essa reação de imobilização não foi satisfatória.

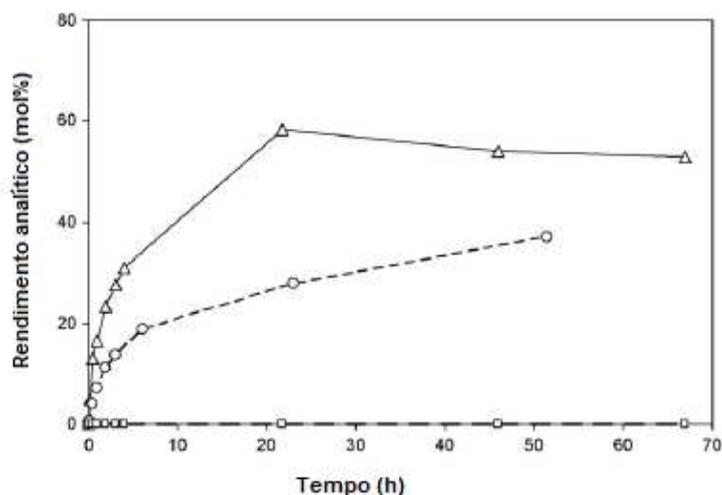


Figura 7 – Rastreia das lipases imobilizadas em polipropileno macroporoso para a síntese de biodiesel, óleo de soja e metanol a 40°C . Lipase *Pseudomonas fluorescens* AK (Δ); *Pseudomonas Cepacia* PS (O) e outras lipases (□). (Salis *et. al.*, 2008)

A eficiência catalítica é a medida da capacidade de uma enzima adaptar-se à superfície do suporte. Assim, o fato de a lipase OS ter uma eficiência catalítica maior que a lipase AK, significa que a lipase OS é mais adaptada do que a lipase AK ao suporte polipropileno.

Keskinler e seus colaboradores (2009) relatam o estudo da síntese da lipase como catalisador da reação de transesterificação para a produção de biodiesel de vários óleos vegetais. A lipase foi imobilizada sobre uma matriz polimérica microporosa (estireno e divinilbenzeno) em diferentes formas. A pesquisa é focalizada em três aspectos do processo: (a) síntese (monolítico, pérola e pó), (b) imobilização da lipase e (c) produção de biodiesel.

A lipase *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada por ligação covalente, com eficiência de 80%, 85% e 89%, e a imobilização foi eficiente utilizando as três formas (monolítico, perla e pó). A enzima imobilizada foi utilizada com sucesso para a produção de biodiesel que usa três óleos diferentes: óleo de

girassol, óleo de soja e óleo de cozinha, a imobilização mostra que a enzima tem atividade durante 10 repetidas reações a 25°C, a cada 24h.

A Figura 8 mostra três tipos de óleos diferentes que foram usados para a síntese do biodiesel, todas as reações foram executadas por 5h a 65°C, o rendimento mais alto foi obtido para o óleo de girassol 63,8%, sendo o resíduo de óleo de cozinha inferior, isto pode ser devido a contaminantes formados no óleo de cozinha afetando a enzima. Este método tem um potencial a ser usado na indústria para a produção de substâncias químicas que requerem enzimas imobilizadas.

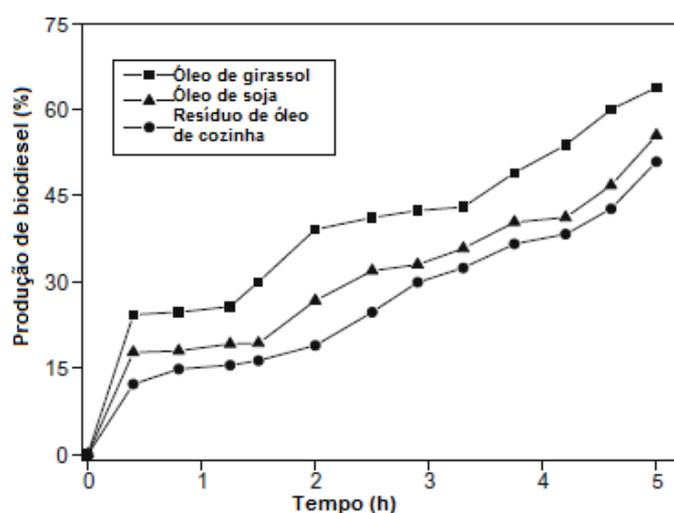


Figura 8 – Variação da eficiência da produção de biodiesel com o tempo para o óleo de girassol, soja e o óleo de cozinha desperdiçado (condições de operação: substrato 21mL/min, temperatura 65°C, reação total 5h) (Keskinler *et. al*, 2009).

Keskinler e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a produção de biodiesel a partir de óleo de canola por transesterificação enzimática utilizando microporos poliméricos. A matriz polimérica pode ser elaborada em um curto espaço de tempo e é um bom suporte para a imobilização de enzima. A lipase de *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada por adsorção e ligação covalente em suportes de copolímero estireno-divinilbenzeno (STY-DVB) e estireno-divinilbenzeno-poliglutaraldeído (STY-DVB-PGA).

A atividade da lipase imobilizada (Figura 9) em STY-DVB diminui em cada lote de reação e, a atividade foi completamente perdida na reação do quinto lote. Este resultado é esperado desde que a imobilização ocorreu devido as interações hidrofóbicas fracas. Considerando que a lipase imobilizada em STY-DVB-PGA manteve sua atividade durante 10 reações, este resultado mostra que a maior parte da imobilização foi devido à ligação covalente. A enzima imobilizada foi estável e manteve sua plena atividade durante 30 dias de armazenamento a 4°C. Sendo que o copolímero STY-DVB-PGA obteve a maior produção de biodiesel a partir do óleo de canola e foi de 97%.

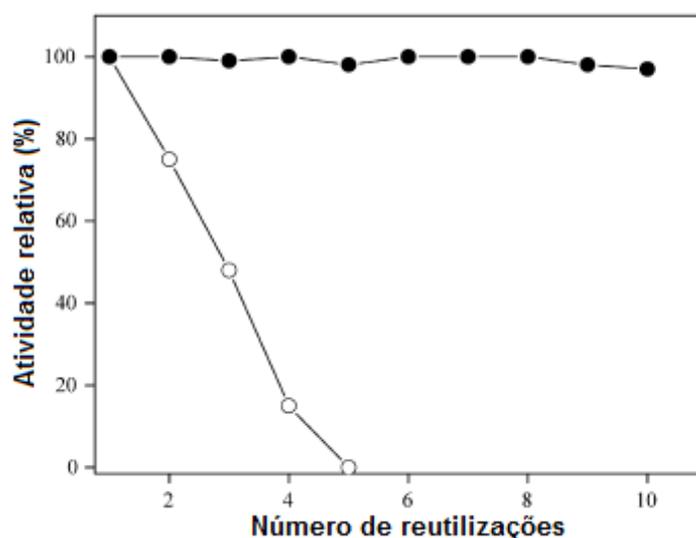


Figura 9 - Estabilidade operacional da lipase imobilizada em copolímero STY-DVB (O) E copolímero STY-DVB-PGA (●). (Keskinler *et. al.*, 2009)

Pereira e seus colaboradores (2010) realizaram um trabalho que objetivou estabelecer um processo enzimático que possibilitasse a produção de ácidos graxos de elevado valor agregado a partir de um substrato de fácil disponibilidade comercial. Para esta finalidade, foi utilizada, como sistema-modelo, a hidrólise de óleo de girassol e milho, catalisado por uma lipase comercial e a quitosana como suporte.

A imobilização foi pelo método de ligação covalente e a atividade hidrolítica pelo método de hidrólise. Primeiro, procedeu-se a caracterização prévia da lipase para que se pudesse descobrir sua melhor atuação na reação

de hidrólise. Os resultados com a enzima livre foram satisfatórios, onde o melhor pH foi de 7,50 para ambos os substratos. O efeito da concentração do substrato foi de 50% para o óleo de girassol e 30% no óleo de milho, como exposto na figura 10 e 11. Houve uma maior atividade quando utilizado o substrato óleo de milho em relação ao óleo de girassol.

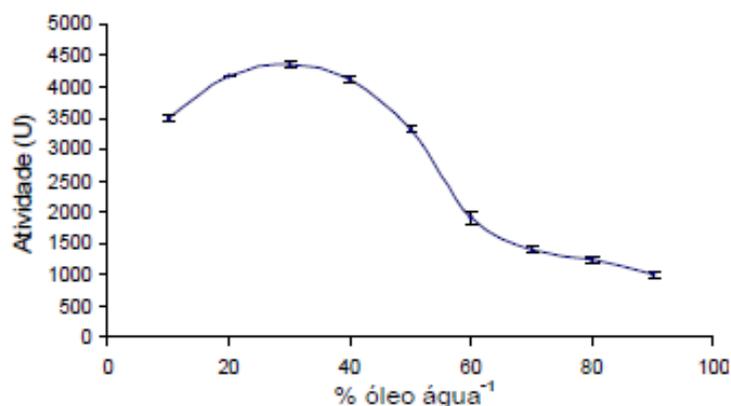


Figura 10 – Atividade hidrolítica em função da concentração (óleo de milho).
(Pereira *et. al.*, 2010)

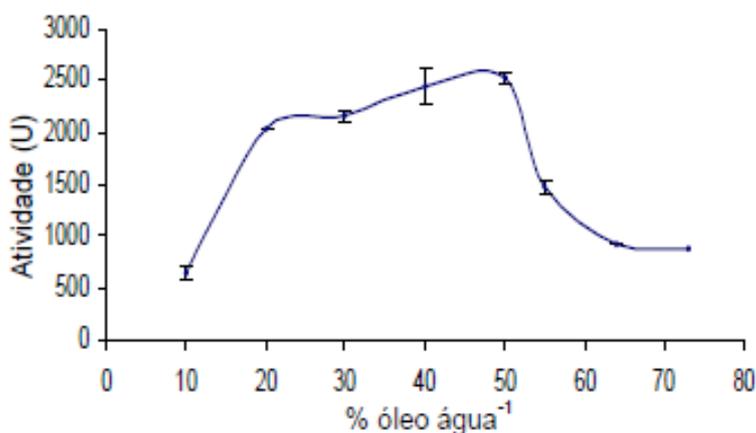


Figura 11 – Atividade hidrolítica em função da concentração (óleo de girassol).
(Pereira *et. al.*, 2010)

Após esta etapa a enzima foi imobilizada em suportes natural, de baixo custo, biodegradável e com boa estabilidade térmica à quitosana. A atividade foi realizada em teste de batelada por 5min para se comparar a atividade da enzima imobilizada em óleo de milho que apresentou uma atividade de 320 unidades. Os resultados foram relativamente baixos quando comparados com

a enzima livre, porém, a enzima imobilizada proporciona maior estabilidade e reprodutibilidade, podendo ser realizada por maior espaço de tempo para a hidrólise dos substratos selecionados, porém as condições que foram realizadas os testes de atividade não foram satisfatórios.

2.3 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM SUPORTES POLIMÉRICOS

Enzimas imobilizadas são definidas como enzimas fisicamente confinadas ou localizadas numa certa região definida no espaço com retenção de sua atividade catalítica, as quais podem ser usadas repetidamente e continuamente (Comerlato, 1995).

As enzimas imobilizadas são aquelas que estão em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio de reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio. As pesquisas sobre este assunto intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização, quer por meios físicos ou químicos (Machado, 2008).

As enzimas imobilizadas possuem várias vantagens sobre as enzimas livres, tais como reutilização sem um significativo decréscimo da atividade, a alta estabilidade e o controle e a facilidade de separação do produto. As vantagens básicas das enzimas imobilizadas em relação as livres são:

- Redução do uso de enzima, pois uma vez imobilizada, a enzima pode ser usada por um maior período de tempo em relação à forma solúvel;
- Processos com enzimas imobilizadas podem ser conduzidos preferencialmente de modo contínuo, usando leitos fixos ou fluidizados, por ser facilmente controlado;
- Uso de alta dosagem de enzima por volume de reator comparado ao uso de enzimas livres;
- Os produtos são facilmente separados do meio reacional;
- Em muitos casos, a estabilidade e a atividade são aumentadas pela imobilização;

- Esta técnica permite a redução do capital operacional já que a vida útil de uma enzima imobilizada é suficientemente longa.

Assim, de modo geral, a utilização de materiais imobilizados pode diminuir o custo do processo, e se a enzima puder ser imobilizada num suporte sem perda de atividade por um razoável período de tempo, a mesma amostra de enzima imobilizada poderá ser usada várias vezes, significando uma economia em processos industriais (Comerlato, 1995). Além disso, muitas vezes com o processo de imobilização as propriedades enzimáticas são alteradas, produzindo biocatalizadores com atividade, especificidade e estabilidade aumentadas dependendo do tipo de imobilização e da enzima. Dependendo do tipo de imobilização, os métodos podem ser trabalhosos e bastante demorados e acarretarem custos adicionais na produção de um biocatalizador. Para que estas desvantagens sejam minimizadas, é necessário conhecer as propriedades do suporte, a natureza da enzima e as condições (técnicas) de imobilização. (Machado, 2008)

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

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalizador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade catalítica superior. A Figura 12 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Nascimento *et. al.*, 2004)

Muitas técnicas de imobilização têm sido reportadas, tais como, derivados poliméricos naturais, materiais inorgânicos como celite, vidro com porosidade controlada, sílica, zeólitas, silicatos, cerâmica, matrizes inorgânicas. O alto custo de suportes populares faz com que haja uma busca de suportes mais baratos.

Dentre estes suportes o que ocupa um melhor lugar são os polímeros em relação aos outros, porque é uma classe de suportes muito importantes no campo da imobilização de biocatalisadores. Os polímeros sintéticos exibem variedades de formas físicas e estruturas químicas que podem ser combinados

para formar um suporte ideal, porém os polímeros naturais levam algumas vantagens quando comparados aos sintéticos, pois geralmente apresentam baixo custo e são facilmente degradáveis não causando danos ao meio ambiente. (Silva, 2007 e Mendes, 2009)

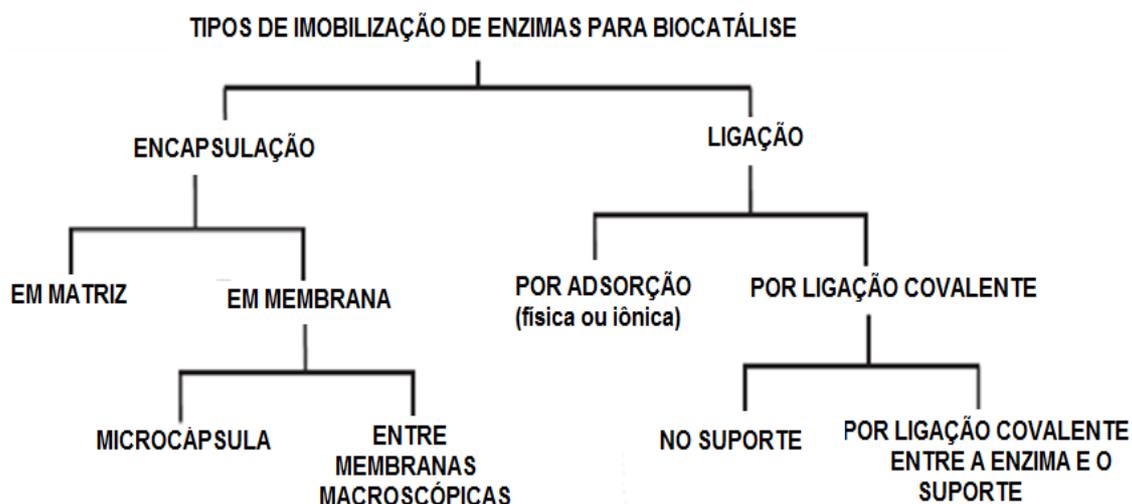


Figura 12 - Tipos de imobilização de enzimas. (Nascimento *et. al.*, 2004)

A tabela 3 abaixo reporta trabalhos encontrados na literatura no período de 1997-2012, utilizando vários suportes, técnicas e enzimas para processos biotecnológicos.

Tabela 3 - Trabalhos reportados da literatura no período de 1997-2012.

Tipos de imobilização	Suporte	Enzima	Referência
Encapsulamento de microcápsula	Alginato	<i>Citocromo C</i>	Rilling <i>et. al.</i> , 1997
Microencapsulamento	Alginato, quitosana e agarose	Lipase <i>Candida rugosa</i>	Neau <i>et. al.</i> , 2002
Adsorção	Metil metacrilato	Pepsin	Li <i>et. al.</i> , 2004

Covalente	Quitosana	Penicillin G. Acylase	Gonçalves <i>et. al.</i> , 2005
Covalente	Quitosana	Laccase	Huang <i>et. al.</i> , 2005
Adsorção	PEI-agarose	Lipase from <i>Candida antarctica</i>	Lafuente <i>et. al.</i> , 2006
Adsorção	Alginato	Lipase <i>Pseudomonas cepacia</i>	Gupta <i>et. al.</i> , 2006
Covalente	Quitosana	Lipase <i>Porcine pancreatic</i>	Devi <i>et. al.</i> , 2006
Adsorção	Quitosana		Xu <i>et. al.</i> , 2007
Covalente	Quitosana	Lipase <i>Pseudomonas fluorescens e Candida rugosa</i>	Foresti <i>et. al.</i> , 2007
Covalente	Quitosana	Porcine pepsin	Cetinus <i>et. al.</i> , 2007
Adsorção	Celulose	Lipase <i>Rhizopus oryzae</i>	Boufi <i>et. al.</i> , 2008
Adsorção	Polipropileno	Lipase <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Salis <i>et. al.</i> , 2008
Adsorção	Polipropileno	Lipase <i>Candida antarctica</i>	Betesti <i>et. al.</i> , 2009
Encapsulamento	K-carragenina	Lipase from <i>Burkholderia cepacia</i>	Ravindra <i>et. al.</i> , 2009
Covalente	Quitosana	Lipase <i>Candida Antarctica</i>	Lee <i>et. al.</i> , 2009
Adsorção e ligação covalente	Estireno-divinilbenzeno	Lipase from <i>Thermomyces lanuginosus</i>	Keskinler <i>et. al.</i> , 2009

Covalente	Quitosana	Lipase <i>Candida Antarctica e Candida rugosa</i>	Orrego <i>et. al.</i> , 2010
Covalente e adsorção	Quitosana	Lipase <i>Kim master</i>	Pereira <i>et. al.</i> , 2010
Adsorção	Fibra de seda	Lipase from <i>candida SP-99-125</i>	Tan <i>et. al.</i> , 2010
Covalente	Alginato-quitosana	<i>Sacharomyces cerevisiae</i> alcohol dehydrogenase	Li <i>et. al.</i> , 2010
Covalente	Alginato	Xylanase	Pal <i>et. al.</i> , 2011
Covalente	Acrilamida	Lipase from <i>Candida rugosa</i>	Zhang <i>et. al.</i> , 2012
Covalente	Quitosana	Lipase from <i>Candida rugosa</i>	Xi <i>et. al.</i> , 2012
Covalente	Quitosana	Lipase from <i>Candida antarctica</i>	Gonçalves <i>et. al.</i> , 2012

Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método único aplicável preferencialmente para todas as enzimas. Portanto, para cada enzima imobilizada é necessário a escolha do método adequado. (Mendes *et. al.*, 2011)

A partir das informações disponíveis sobre as características do suporte e o efeito dos métodos empregados, é possível fazer generalizações que permitam uma primeira seleção do método de imobilização. Enzimas podem ser imobilizadas por diferentes protocolos, isto é, podem ser encapsuladas; adsorvidas e por ligação covalente. (Mendes *et. al.*, 2011)

A adsorção é o método mais simples e o mais empregado, o biocatalisador é estabilizado por interações fracas com o suporte como forças de forças de “van der waals” (interações hidrofóbicas), ligações de hidrogênio e ligações iônicas. As principais vantagens deste processo de imobilização são a facilidade e a simplicidade do processo, a grande desvantagem é a dessorção

da enzima devido às variações de temperatura, pH e força iônica. (Machado *et al.*, 2008)

A encapsulação consiste na retenção física da enzima nas cavidades internas de uma matriz sólida porosa constituída geralmente por polímeros entrecruzados como poliacrilamida, gelatina, alginato e silanos. As principais vantagens de encapsulação de enzimas referem-se à grande área superficial para contato do substrato e da enzima no interior de um volume relativamente pequeno, e a possibilidade de imobilização simultânea de diferentes enzimas em uma única etapa. Como principais desvantagens, têm-se: a restrição de que os biocatalisadores podem ser aplicados somente com substratos de baixa massa molecular; a possível inativação da enzima durante o procedimento de imobilização; a alta concentração de enzima necessária para garantir a encapsulação e, os possíveis efeitos de difusão de substratos e/ou produtos no interior da matriz porosa. (Mendes *et al.*, 2011)

2.3.1 - LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE POLIMÉRICO

A utilização de proteínas modificadas quimicamente teve início no final da década de 50, sendo que a técnica foi originalmente desenvolvida para auxiliar na elucidação da estrutura de proteínas. Desde o final da década de 70, muitos trabalhos de modificação de proteínas para o uso em síntese têm sido apresentados com o objetivo de alterar e melhorar as propriedades da lipase nativa (Nascimento *et al.*, 2004).

Este tipo de imobilização em suporte insolúvel é realizado através da ligação covalente de grupos funcionais não ativos da enzima, isto é, não essenciais para a sua atividade catalítica, a grupos reativos (como por exemplo, hidroxila, carbonila, amino, fenólico, imidazólico, tiol) ligados na superfície do suporte insolúvel.

Os suportes insolúveis mais utilizados incluem polímeros naturais como, por exemplo, celulose, agar-agar, colágeno, amido, e materiais inorgânicos como por exemplo óxidos metálicos e pérolas de vidro como porosidade controlada.

Fatores tais como, capacidade de ligação química, facilidade de ligação química e a estabilidade do suporte são obviamente importantes. Como um exemplo, celulose e seus derivados são muito utilizados porque suas propriedades hidrofílicas favorecem e mantêm a atividade catalítica das enzimas (Comerlato, 1995).

Além de apresentar a vantagem em relação à técnica de adsorção por não apresentar o fenômeno de dessorção, são usualmente muito estáveis e resistentes em condições extremas (faixa de pH, temperatura e influência de solventes orgânicos). (Silva, 2007) Os derivados preparados podem ser empregados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado e, a carga da enzima permanece constante após a etapa de imobilização. A seleção das condições para a imobilização por ligação covalente é mais difícil que em outros métodos de ligação em suportes. (Mendes *et. al.*, 2011)

A ligação covalente cruzada é obtida utilizando reagentes bifuncionais, como, por exemplo, o glutaraldeído, o qual reage diretamente com grupos amino da enzima. O método de imobilização com o glutaraldeído é um dos mais empregados, pois a enzima geralmente é mantida num ambiente semelhante ao encontrado na natureza, conferindo-lhe boa estabilidade frente às variações de pH, força iônica, solventes e temperatura (Comerlato, 1995).

Gonçalves e seus colaboradores (2005) realizaram estudos com o objetivo de avaliar a imobilização da enzima Penicillin g. acylase (PGA) em quitosana ativada com glutaraldeído, a fim de produzir um biocatalizador de baixo custo. No entanto, a recuperação e reutilização de enzimas livres como catalisadores são muito limitadas e isso resultou no desenvolvimento de uma ampla variedade de técnicas de imobilização. A imobilização também oferece vantagens operacionais sobre a enzima livre, tais como, reações rápidas e possibilidade de controlar a formação do produto. O artigo aborda as possibilidades de utilização da quitosana para alcançar a estabilidade do PGA via ligação covalente. Além disso, o transportador é muito barato e o processo muito simples, o que torna esta enzima boa para as grandes aplicações industriais.

Devi e seus colaboradores (2006) realizaram um estudo onde é feita a tentativa de otimizar as condições de imobilização covalente da enzima em suportes de quitosana e subsequente a alcoólise de óleos utilizando a enzima livre e imobilizada. A seleção de um suporte e o método de imobilização são muito importantes para a reação enzimática desejada, sendo a quitosana um suporte natural, biodegradável, com pouca ou nenhuma toxicidade e economicamente mais barato.

A estabilidade térmica da enzima é um dos fatores mais importantes para sua aplicação, a enzima ligada covalentemente apresentou melhor estabilidade em todas as temperaturas e períodos de tempo, figura 13.

A razão molar ótima de óleo/metanol na reação de alcoólise requerido foi observado como sendo 01:03, para a enzima livre e imobilizada. Aumentando a razão molar a proporção de metanol ao óleo diminui o grau de alcoólise. Isto pode ser atribuído à possível distorção da camada de água essencial para atividade da enzima pelo excesso de metanol, figura 14.

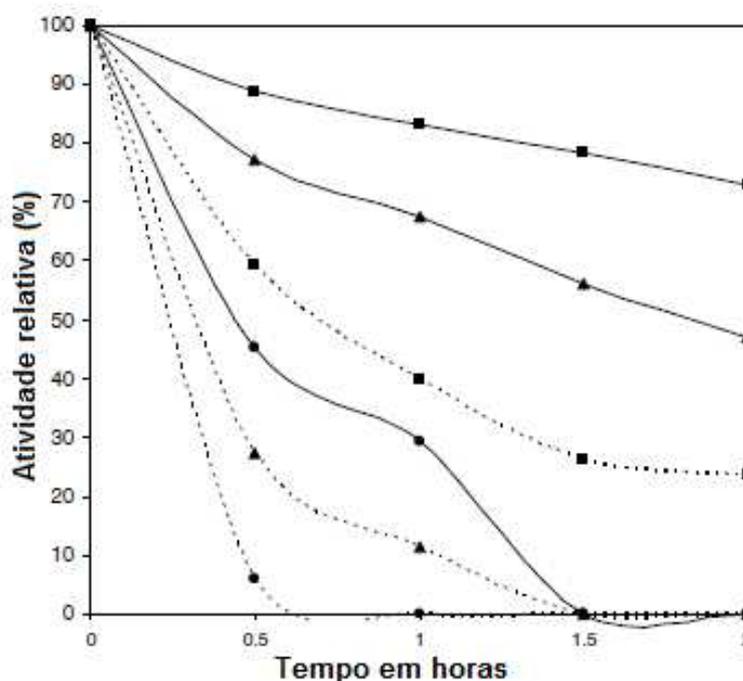


Figura 13 - Efeito da temperatura e da atividade da enzima livre e imobilizada pH 8,0, 40°C (●), 50°C (▲), 60°C (■), enzima livre (----) e imobilizada (—). (Devi *et. al.*, 2006)

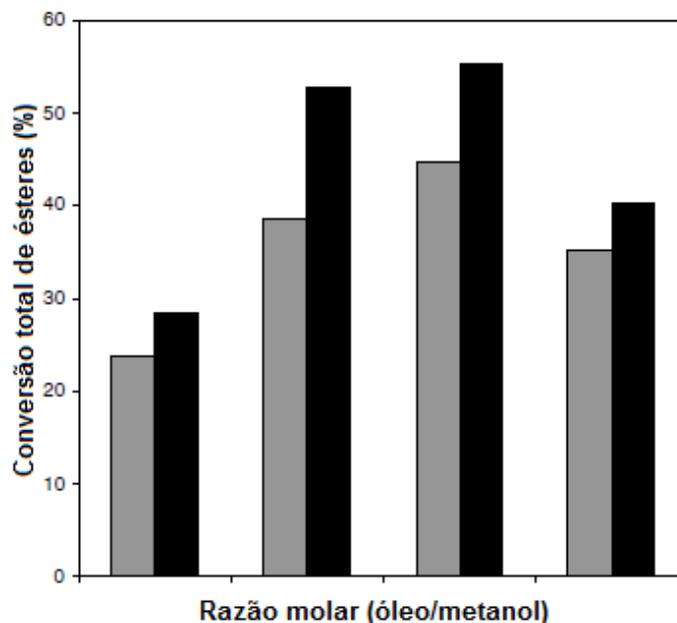


Figura 14 - Efeito da razão molar na conversão de alçóólises produzido usando enzima livre (■) e imobilizada (■). (Devi *et. al.*, 2006)

Cruz (2007) realizou um estudo sobre a imobilização de lípase comercial (Lipozyme CALB L) em esferas de quitosana funcionalizadas com várias concentrações de glutaraldeído e avaliar a melhor concentração para posterior imobilização. Constatou-se que a concentração de 3% (v/v) foi a que proporcionou a enzima maior estabilidade e conferiu a mesma maior atividade residual. A figura 15 mostra micrografias das esferas de quitosana imobilizada e ativada com glutaraldeído.

A síntese de biodiesel com a enzima CALB L imobilizada em esferas de quitosana e o seu reuso foi realizado por 12 ciclos. Quanto a conversão de ésteres com esferas de quitosana imobilizadas covalentemente com CALB L, houve uma conversão superior a 90% em 6 reusos em 12 ensaios (Figura 16), mas o seu reuso fica prejudicado com a baixa resistência mecânica das esferas de quitosana, devido a agitação das esferas provocando a quebra das mesmas, isto é constatado com um declínio da atividade enzimática e conseqüentemente da conversão de biodiesel.



Figura 15 - Esferas de quitosana immobilizadas com CALB L com glutaraldeído 3%.
(Júnior, 2007)

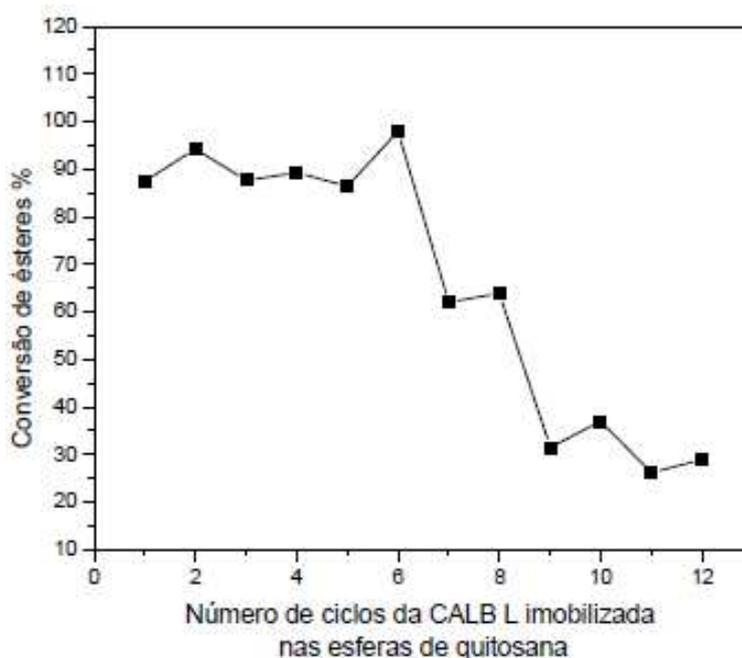


Figura 16 - Conversão de ésteres versus número de ciclos da enzima immobilizada nas esferas de quitosana ativadas com solução de glutaraldeído 3% (v/v). (Júnior, 2007)

Cetinus e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com esferas de quitosana que foram preparadas, utilizando um agente de ligação cruzada o glutaraldeído, e as esferas resultantes foram empregados na

imobilização de enzimas. As esferas de quitosana foram expostas a uma solução de glutaraldeído, que é irreversível a ligação cruzada que pode conduzir as esferas de quitosana a exibir estabilidade operacional elevada.

A faixa de temperatura ideal para a enzima livre e imobilizada (Figura 17) foi encontrado na faixa de 30-40°C e 40-50°C, respectivamente. A flexibilidade conformacional da enzima foi afetada pela imobilização. A imobilização de enzimas em esferas de quitosana causou um aumento na rigidez da enzima que é geralmente refletido pelo aumento da estabilidade para a desnaturação pelo aumento da temperatura. Ao comparar o desempenho de biocatalisadores imobilizados, destinados a utilização na indústria, a caracterização da sua estabilidade operacional é importante.

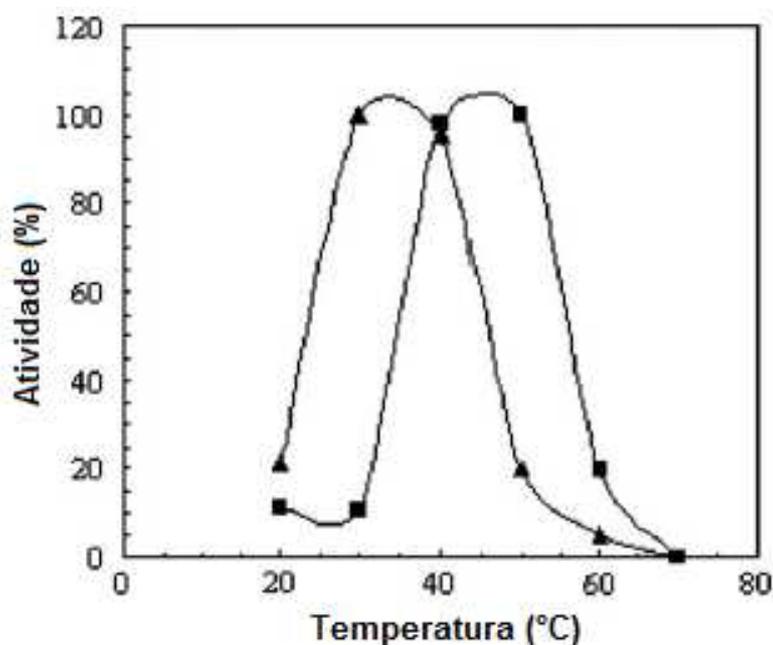


Figura 17 - Efeito da temperatura na atividade da enzima livre (▲) e imobilizada (■).
(Cetinus *et. al.*, 2007)

A estabilidade operacional da enzima imobilizada foi avaliada, a figura 18 mostra o efeito do uso repetido sobre a atividade da enzima imobilizada. A enzima imobilizada em esferas de quitosana manteve uma atividade específica de 95% após três reutilizações, depois a atividade reduz gradualmente.

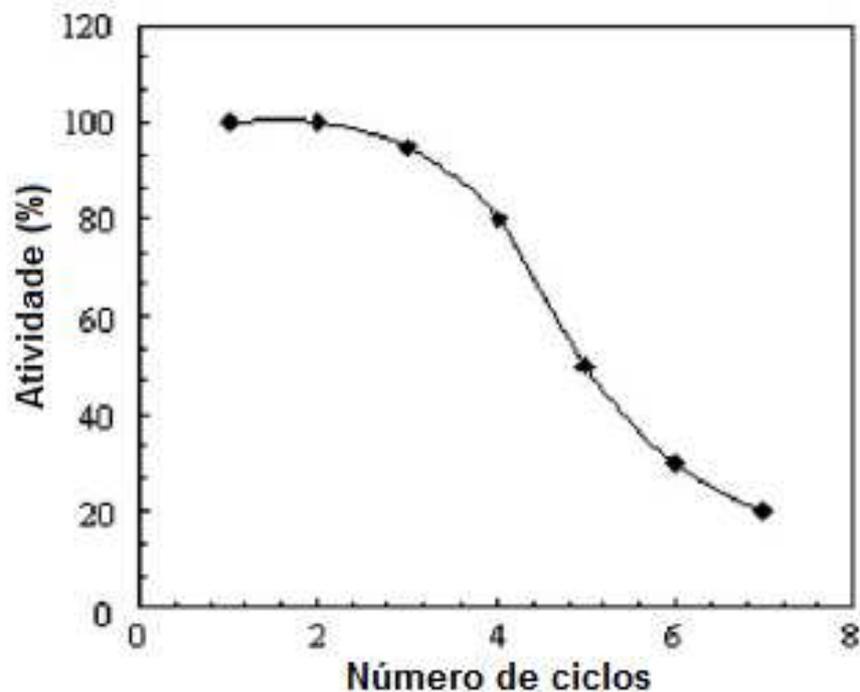


Figura 18 - Reutilização da enzima imobilizada a 40°C. (Cetinu s *et. al.*, 2007)

2.4 – SUPORTES POLIMÉRICOS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS COM ENZIMAS IMOBILIZADAS POR LIGAÇÃO COVALENTE

Huang e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo com microesferas de quitosana magnética preparadas utilizando-se glutaraldeído como reagente de ligação cruzada para a imobilização de enzimas. A quitosana foi escolhida por ser um polímero natural e um suporte ideal para imobilização de enzimas.

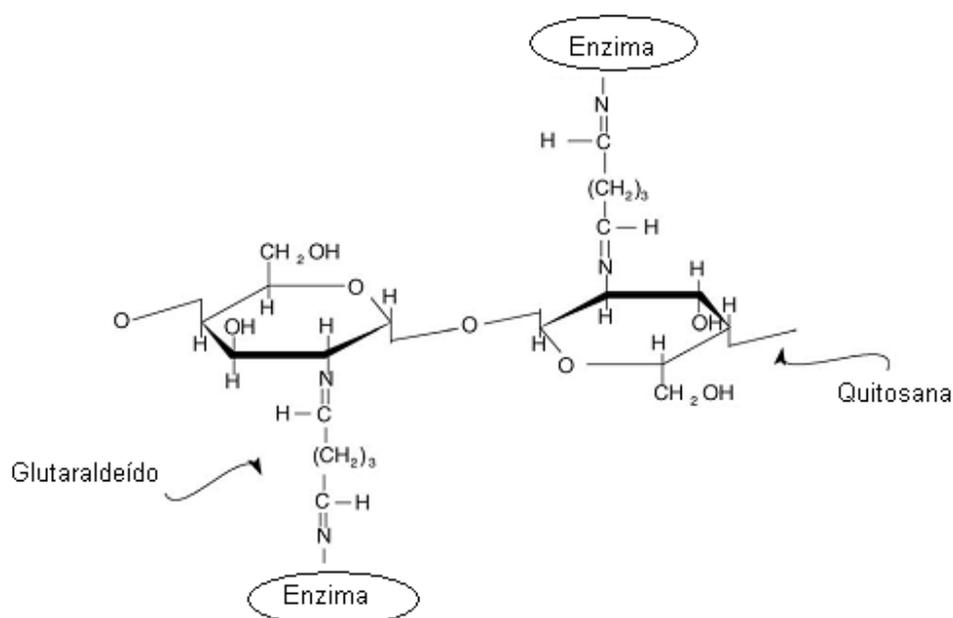


Figura 19 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microesferas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído (Huang *et. al.*, 2005).

Sendo utilizado com material de apoio, os transportadores magnéticos podem ser facilmente separados do meio da reação e efetivamente controlados pela aplicação de um campo magnético. Assim, a eficiência de catalisadores e propriedades de estabilidade da enzima pode ser muito melhorada. A Figura 19 mostra a reação do grupo aldeído, próximo à superfície das esferas, interagindo com o grupo amino da enzima. A figura 20 mostra as micrografias da quitosana natural (a) e das microesferas de quitosana magnética, que tem uma forma esférica com uma superfície lisa.

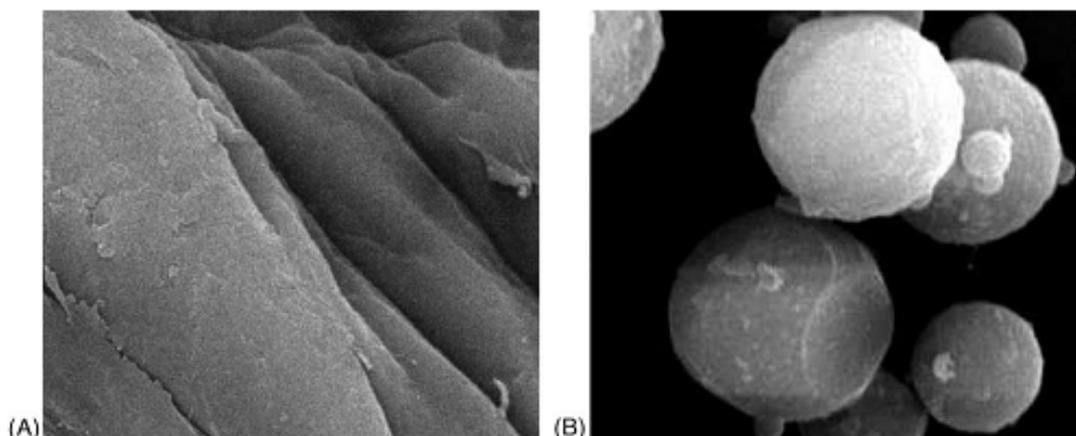


Figura 20 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microesferas magnéticas da quitosana. (Huang *et. al.*, 2005)

A atividade da enzima foi determinada, como mostra a figura 21, a atividade foi aumentada em primeiro lugar, em seguida, diminui com o aumento da concentração de glutaraldeído, obtendo uma atividade máxima a 8% de glutaraldeído. No entanto, como a concentração superior a 8% de glutaraldeído a vasta interação das enzimas individuais com grupos aldeídos à superfície das microesferas mudaria a conformação da enzima e provocaria a queda da atividade da enzima imobilizada.

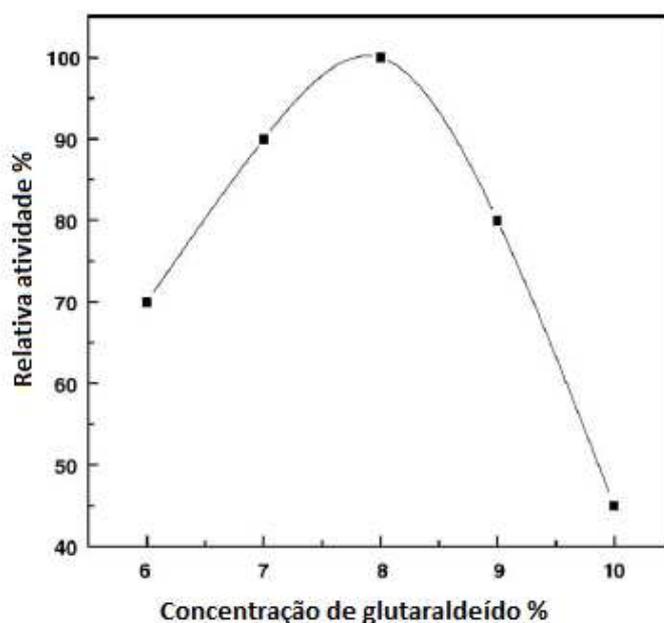


Figura 21 – Efeito da concentração de glutaraldeído na imobilização da enzima (Huang *et. al.*, 2005).

O resultado indica que a enzima imobilizada teve uma boa reutilização, e teve uma melhor estabilidade de armazenamento e temperatura.

Hasirci e seus colaboradores (2011) relataram um estudo sobre a imobilização da enzima lacase, em nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4). Para a imobilização das nanopartículas de Fe_3O_4 foi revestidas e funcionalizadas com quitosana (CS), a lacase foi imobilizada por adsorção e por ligação covalente após a ativação dos grupos hidroxila da quitosana com carbodiimida (EDAC) ou cloreto cianúrico (CC).

As propriedades magnéticas, magnetização de saturação e superparamagnetismo (figura 22) das nanopartículas de Fe_3O_4 e Fe_3O_4 -CS foram pesquisadas por análise de VSM em temperatura ambiente. Houve uma diminuição da magnetização de saturação das nanopartículas depois do revestimento, que pode ser explicado pela diminuição na quantidade dos momentos magnéticos. A magnetização de saturação das nanopartículas CS/ Fe_3O_4 é de 25,2emu/g, apresenta histerese e são paramagnéticas, propriedades que precisam ser melhoradas para biocatalisadores a ser utilizados em reatores de leito fluidizado com campos magnéticos.

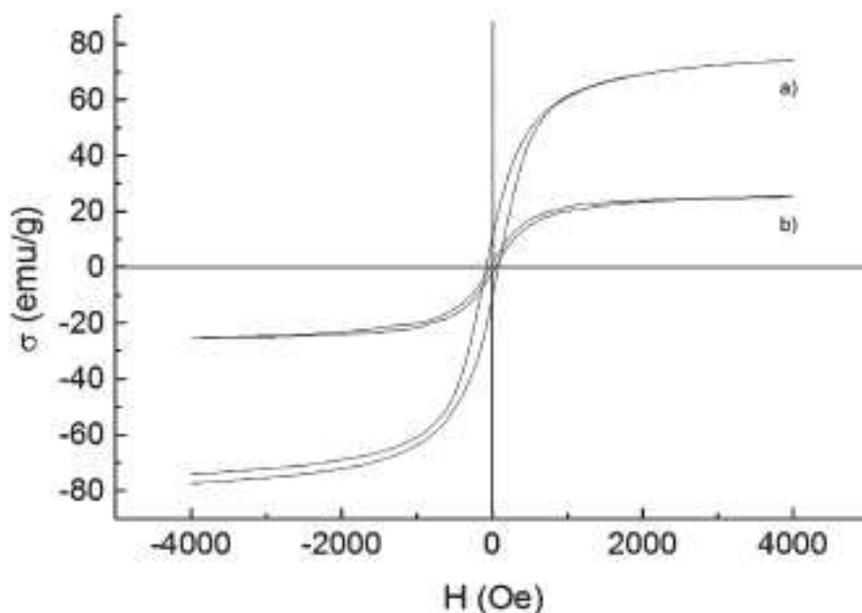


Figura 22 - Magnetização contra campo magnético de nanopartículas (a) Fe_3O_4 , (b) Fe_3O_4 -CS. (Hasirci *et. al.*, 2011)

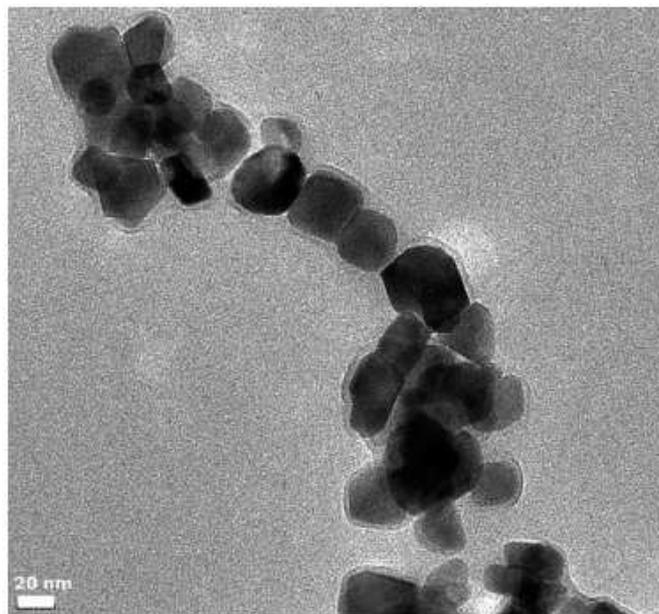


Figura 23 - Imagens do MET das nanopartículas de CS-Fe₃O₄(escala de 20nm).
(Hasirci *et. al.*, 2011)

O tamanho das nanopartículas (Figura 23) de Fe₃O₄-CS foi estimado a partir de análise de TEM, com uma larga distribuição de tamanho numa escala nanométrica propriedades que não propicia a sua utilização na imobilização de enzimas para obtenção de biodiesel.

A reutilização de enzimas imobilizadas é um dos aspectos mais importantes para aplicações industriais. A capacidade de reutilização foi examinada usando lacase imobilizada repetidamente 30 vezes em 1 dia. As atividades retidas (Figura 24) para Fe₃O₄-CS-L, Fe₃O₄-CS-EDAC-L e Fe₃O₄-CS-CC-L forma encontrados mais de 85% para todos os sistemas. Os maiores valores foram obtidos para o sistema de imobilização covalente (Fe₃O₄-CS-EDAC-L e Fe₃O₄-CS-CC-L) em função do agente de ativação da ligação entre a enzima e o apoio.

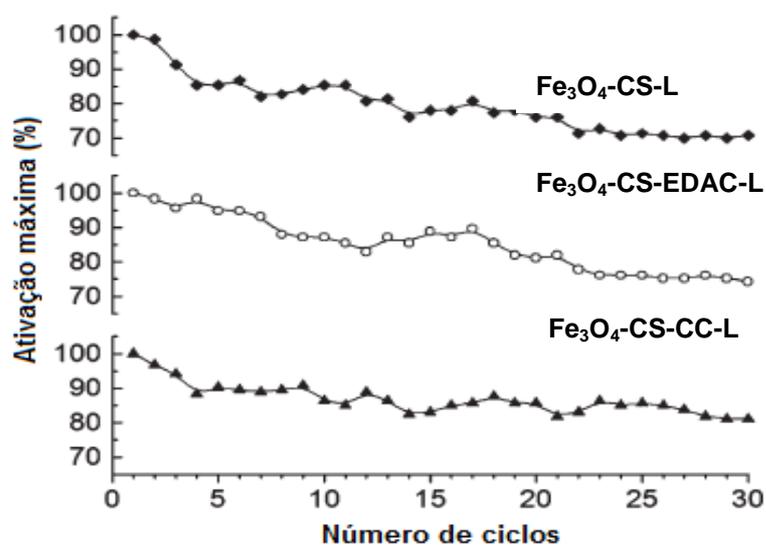


Figura 24 - Efeito do número de atividades de reutilização da enzima imobilizada.
(Hasirci *et. al.*, 2011)

Zhang e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a imobilização da enzima pullulane por ligação covalente em esferas de quitosana com propriedades magnéticas por ligação cruzada com glutaraldeído. As nanopartículas magnéticas foram preparadas pelo método de co-precipitação e revestida com quitosana para que as magnetitas possam estar protegidas contra a corrosão, mas também oferecendo mais flexibilidade a grupos funcionais. As esferas de CS magnética tiveram uma forma esférica regular e com um diâmetro médio de 86nm.

A figura 25 mostra que as nanopartículas magnéticas exibiram excelente susceptibilidade magnética a um campo magnético aplicado, e sua magnetização de saturação (MS) foi determinada com sendo 52,6emu/g.

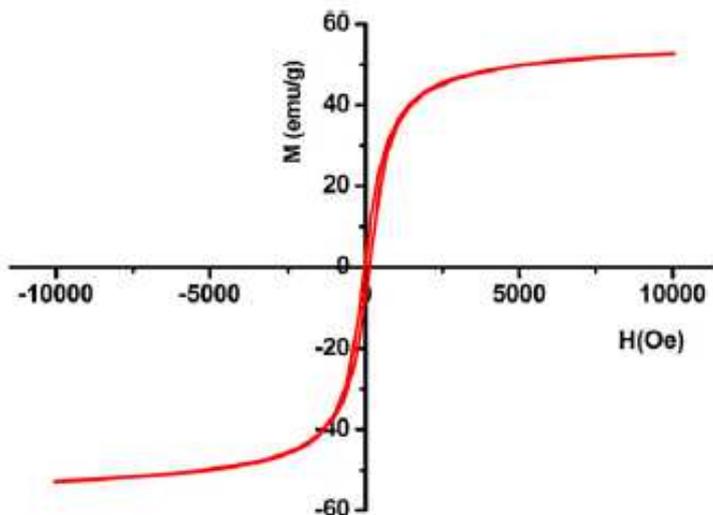


Figura 25 - Ciclo de histerese magnética de esferas de quitosana magnética. (Zhang *et. al.*, 2009)

A estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada foi determinada a 70°C, como pode ser observada na figura 26 (a), a atividade da enzima imobilizada diminui lentamente em função do tempo de incubação, 6 horas mais tarde, a atividade residual da enzima livre e imobilizada foi de 12,3% e 53,6% da atividade inicial.

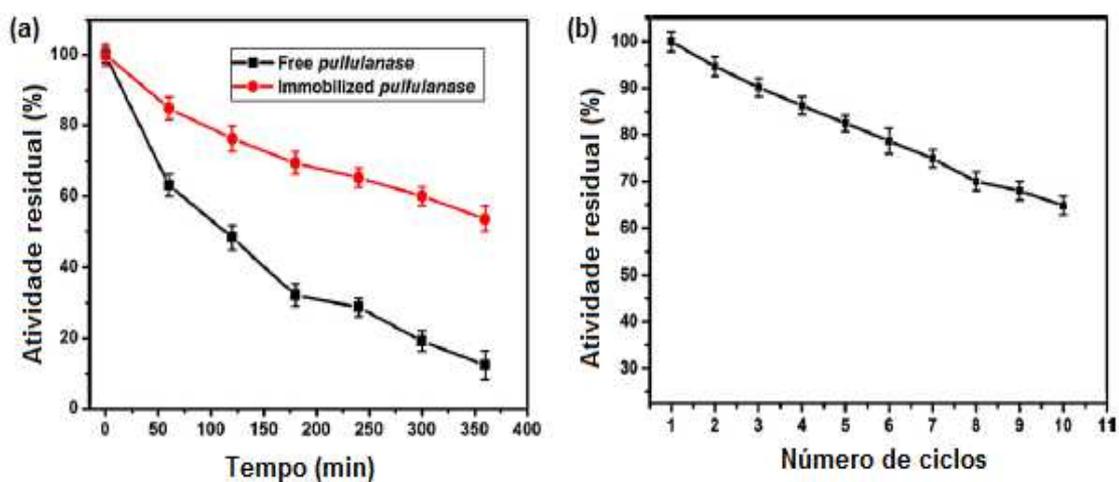


Figura 26 - (a) Estabilidade térmica e (b) de operação de pululanase imobilizada. (Zhang *et. al.*, 2009)

A enzima imobilizada em esferas de quitosana magnética conduziu a um efeito estabilizador significativo para a desnaturação. A estabilidade operacional da enzima imobilizada mostrada na figura 26 (b). Depois de 10 operações consecutivas, a enzima imobilizada poderia reter 64,8% de atividade residual.

2.4.1 – SUPORTES POLIMÉRICOS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS IMOBILIZADO COM ENZIMAS POR LIGAÇÃO COVALENTE NA PRODUÇÃO DE BIOCOMBUSTÍVEIS

Xie e seus colaboradores (2012) realizaram um estudo com microesferas de quitosana magnética, utilizando glutaraldeído como reagente de ligação cruzada para a imobilização da lipase. Os efeitos de vários parâmetros de transesterificação na conversão enzimática de óleo de soja.

Um dos parâmetros que afetam a transesterificação enzimática é a dosagem da lipase imobilizada. A variação de conversão de ésteres de metil, com diferentes cargas foram utilizadas. Como mostra a figura 27, a conversão de 87% foi obtida com 60% de fração de massa da lipase.

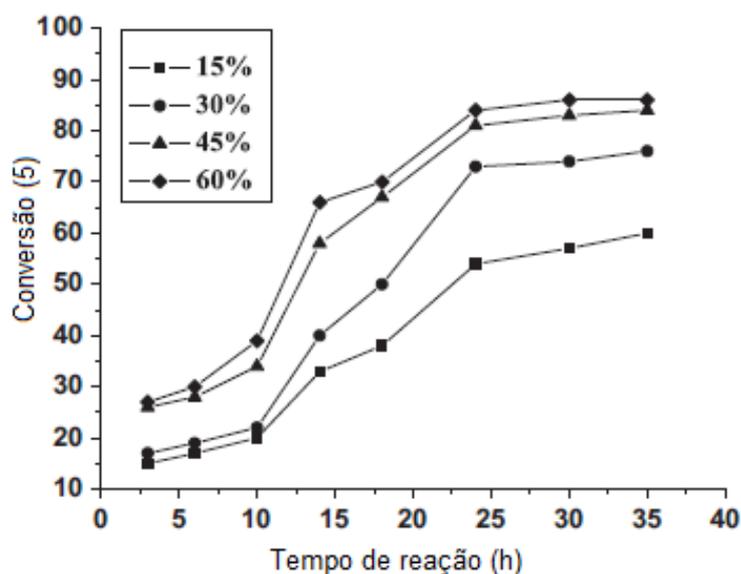


Figura 27 - Efeito de várias quantidades de lipase imobilizada em transesterificação enzimática de óleo de soja. (Xie *et. al.*, 2012)

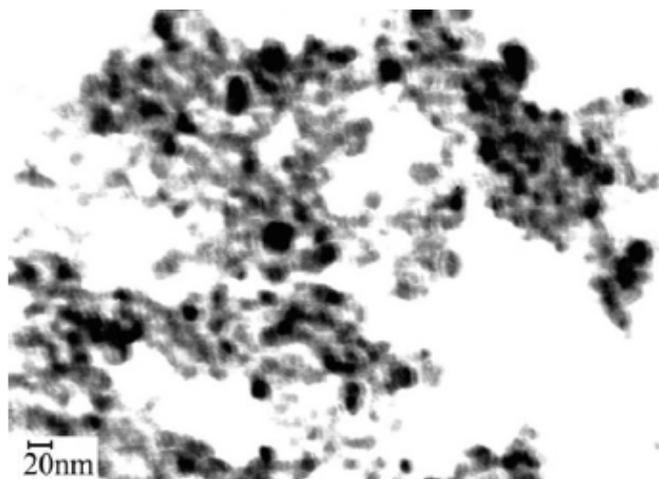


Figura 28 - Micrografias do MET das nanopartículas de CS-Fe₃O₄. (Xie *et. al.*, 2012)

A figura 28 apresenta as micrografias das nanopartículas de quitosana-Fe₃O₄ com uma larga distribuição de tamanho. Partículas nanométricas não são favoráveis para a produção de biodiesel, pois para operar em reator de leito fluidizado assistido por campos magnético o custo seria mais elevado.

Superparamagnetismo é uma propriedade especialmente importante e necessária para suportes magnéticos. Além disto, ele pode ser observado na figura 29 o momento magnético das nanopartículas de Fe₃O₄ que diminui ligeiramente depois de revestido com quitosana e a superfície imobilizada com a lipase, a curva de susceptibilidade magnética tem baixa histerese, e revela que as nanopartículas magnéticas eram quase superparamagnética.

As propriedades magnéticas das microesferas de quitosana é uma vantagem significativa para a imobilização de enzimas em comparação com os suportes não magnéticos. Devido a manter um elevado valor de saturação de magnetização, a lipase imobilizada pode ser facilmente separada a partir da mistura de reação usando os magnetos externos permanentes. Utilizando um campo magnético, o movimento da lipase imobilizada no reator pode ser controlado de forma eficaz.

A atividade catalítica da lipase imobilizada foram medidas a várias temperaturas, variando de 25°C a 45°C, e os resulta dos está ilustrada na figura 30, a mais elevada conversão de ésteres metílicos foi obtido com o aumento da temperatura de reação a 35°C. A lipase imobilizada começa a diminuir a

conversão de ésteres etílicos no 5º ciclo de reutilização, o que teve uma boa capacidade de reutilização o que seria desejável para aplicações em biotecnologia. Nos estudos de reutilização, a perda de atividade pode ser atribuída a alterações conformacionais da enzima ou desativação da lipase durante o procedimento de reação.

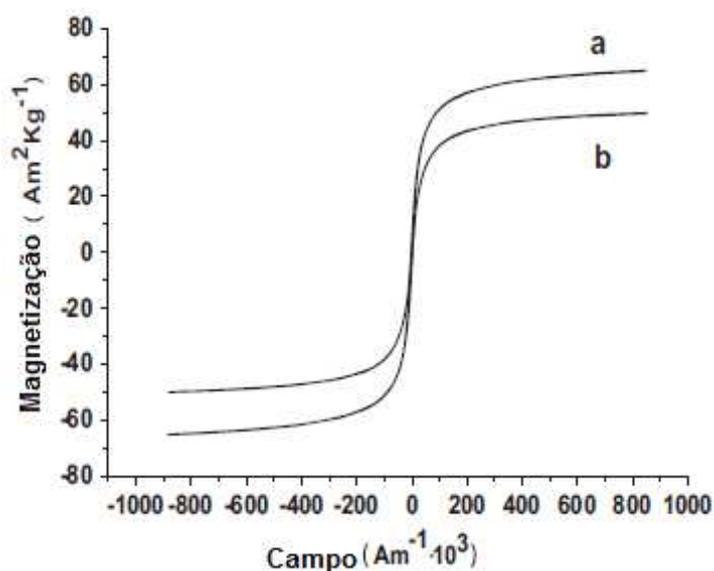


Figura 29- Curvas de magnetização para (a) Fe₃O₄, (b) Fe₃O₄ com microesferas de quitosana imobilizada com lipase. (Xie *et. al.*, 2012)

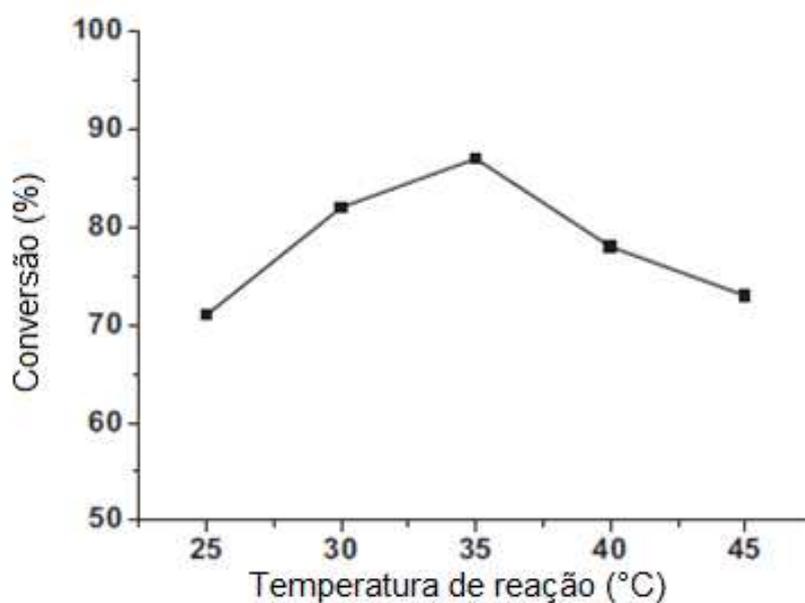


Figura 30 - Efeito da temperatura da reação da enzimática na transesterificação de óleo de soja. (Xie *et. al.*, 2012)

Santos (2009) realizou um estudo com o objetivo de formular e caracterizar microcápsulas magnéticas de quitosana para atuarem como suporte em processos de produção de biodiesel, a ser utilizada num reator assistido por campo magnético.

As microcápsulas formuladas utilizando a técnica de coagulação (Figura 31) com a quitosana/ Fe_3O_4 , apresentaram uma superfície relativamente lisa quando utilizadas soluções com concentrações de quitosana de 3% m/m e mais porosa para concentrações de 2%.

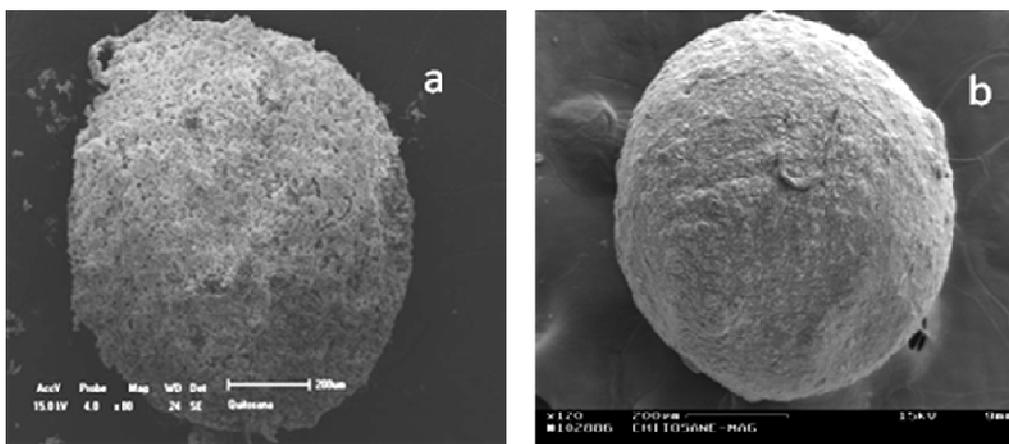


Figura 31 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 (a) concentração 2% e (b) concentração 3%. (Santos, 2009)

Aproximadamente 75% das microcápsulas magnéticas (a) apresentaram um diâmetro médio entre 400 e 600 μm e para concentrações maiores (b) entre 500 e 800 μm .

A curva na figura 32 apresenta uma boa saturação de magnetização (13 emu/g), não existência praticamente de histerese, baixos valores de remanescência associado a um comportamento reversível o que prova a presença de partículas com um comportamento superparamagnético.

O superparamagnetismo permite que o suporte responda rapidamente à aplicação do campo magnético e não apresentam uma magnetização permanente ou residual. Outro comportamento importante é que não existe interferência no comportamento magnético das partículas pequenas.

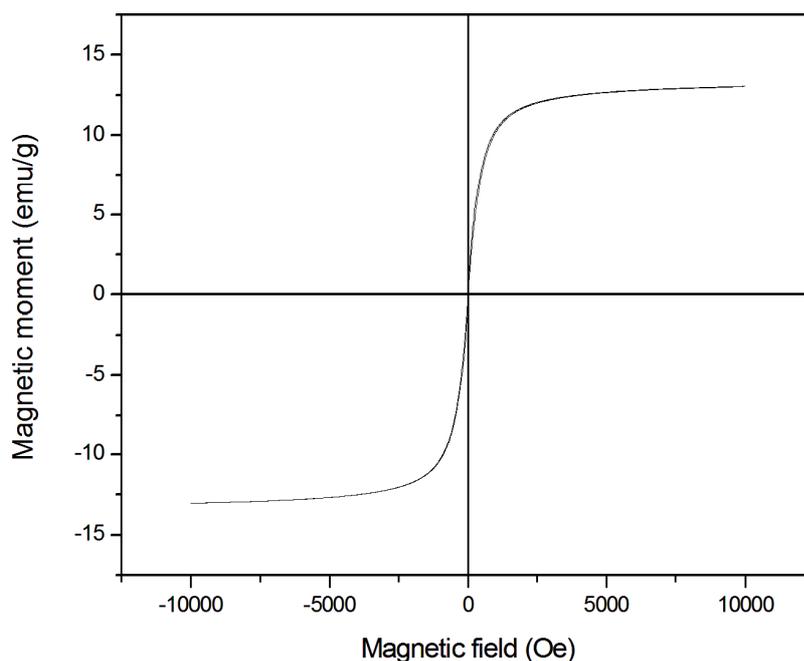


Figura 32 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/Fe₃O₄ (Santos, 2009)

As enzimas foram imobilizadas por adsorção e ligação covalente no suporte (CS/Fe₃O₄). Por ligação covalente foram previamente tratados com uma solução de glutaraldeído. O agrupamento amino foi utilizado para formar uma ligação iminica com o glutaraldeído que a sua vez se liga covalentemente com as enzimas. A figura 33 mostra a imagem do MEV o aspecto dos suportes após a imobilização das enzimas.

Os testes catalíticos, realizados de forma preliminar, utilizando uma emulsão de azeite, água e goma arábica indicaram uma maior atividade catalítica para a enzima imobilizada covalentemente.

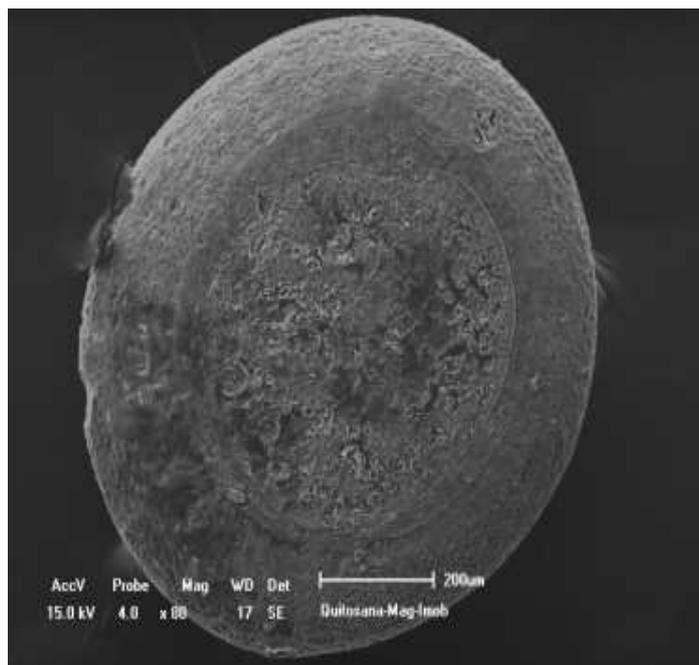


Figura 33 - Microcápsulas de Q/Fe₃O₄ após a imobilização de enzimas.

(Santos, 2009)

2.4.2 – CARÁTER HIDROFÓBICO/HIDROFÍLICO DO SUPORTE E SUA INFLUÊNCIA NA ATIVIDADE DA ENZIMA

A imobilização melhora a atividade e a estabilidade da enzima, sendo a escolha do tipo de imobilização e o caráter hidrofóbico/hidrofílico do suporte importantes para o desempenho da atividade da enzima.

A propriedade da superfície de apoio influencia significativamente a atividade da enzima. Não importa qual é o mecanismo de ativação, a enzima requer uma ativação interfacial ou uma mudança conformacional para abrir a “tampa” que protege o sítio ativo, fundamentalmente para alcançar a hidrólise é a acessibilidade do substrato. Quanto maior a afinidade da superfície do suporte para o substrato, maior o contato com a enzima imobilizada. (Duan *et al.*, 2006)

Na ausência de interfaces, a lipase contém um oligopéptico hidrofóbico (denominado “tampa”), cobrindo seu sítio ativo e tornando-o inacessível aos substratos. No entanto, na presença de interfaces hidrofóbicas, um rearranjo ocorre conformacionalmente, virando a “forma fechada” da lipase em uma

“forma aberta” (Tan *et. al.*, 2010). O suporte com caráter hidrofílico é preferido para a imobilização da lipase, tal apoio não só maximiza a área disponível para a fixação da lipase tornando mais eficiente, mas também mantém a camada de água essencial que rodeia os biocatalisadores e impede o comprometimento da atividade catalítica (Duan *et. al.*, 2006).

Zhan e seus colaboradores (2012) realizaram um estudo com objetivo de investigar as influências das características hidrofóbicas/hidrofílicas de microesferas magnéticas sobre a relação imobilização e a atividade da lipase e desenvolver uma maneira melhor para alcançar o carregamento da enzima e alta atividade.

Foi utilizado como suporte o acetato de vinila, o tipo 1 Figura 34 que determinou uma maior hidrofobicidade. O tipo 2-3 foram caracterizados por grupos amida além de grupos acetatos, a partir do tipo 1 e 3, a quantidade de grupos amida foi aumentada gradualmente, o que significa o aumento da hidrofiliicidade.

Os resultados são apresentados na Figura 35, como pode ser visto, quando a superfície da microesfera estava com acetato de vinila (tipo 1) a proporção da imobilização da lipase foi mais elevado, com o aumento de acrilamida (AAM) (tipo 2-3), a relação da imobilização diminui significativamente.

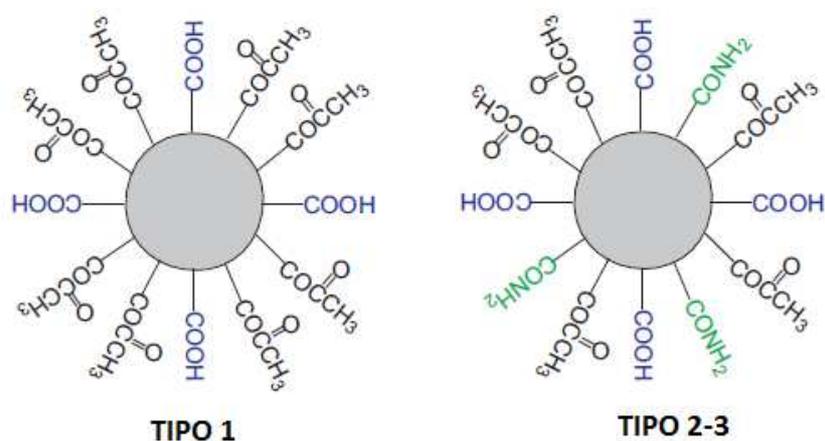


Figura 34 - Diferentes estruturas da superfície de polímeros magnéticos (Zhang *et. al.*, 2012).

Por outro lado, a sua recuperação da atividade não foi muito elevada (tipo 1). A partir do tipo 1 para o 2, indicando um aumento na hidrofiliicidade a recuperação da atividade foi aumentada em cerca de 17%. No entanto, com o aumento contínuo de AAM (tipo 2 para o 3) a recuperação da atividade diminuiu seriamente

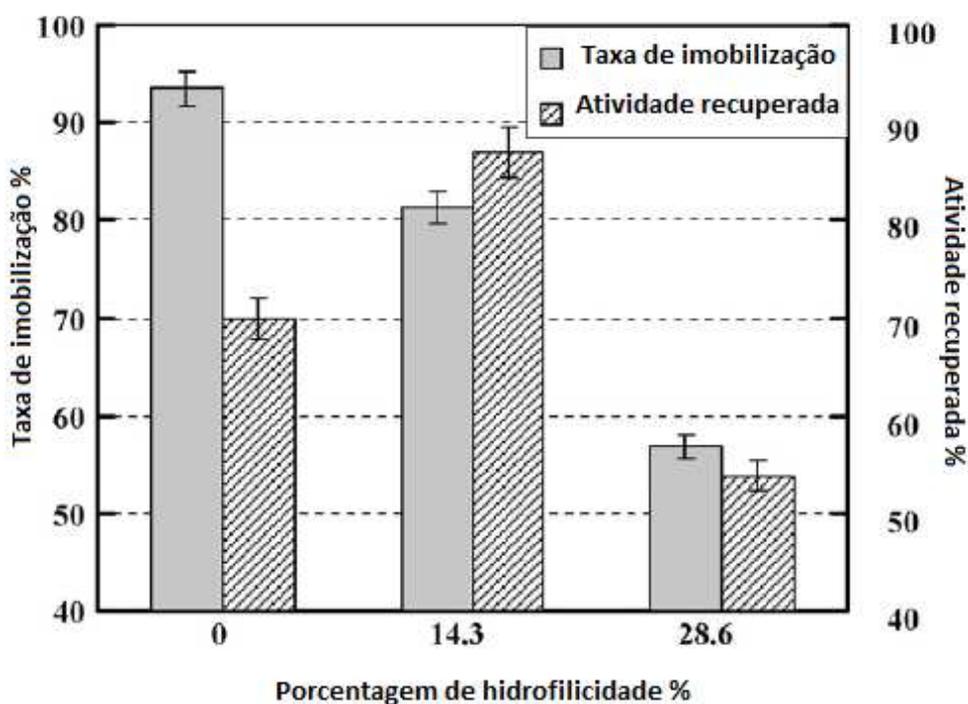


Figura 35 – Efeito da hidrofobicidade/hidrofiliicidade de microesferas magnéticas imobilizadas (Zhang *et. al.*, 2012).

Na Figura 36 as propriedades hidrofóbicas de apoio podem tornar-se o sítio ativo da lipase aberto e ativar sua atividade enzimática. Por outro lado, as propriedades hidrofílicas de suporte asseguravam a “água necessária” para a lipase. Assim as microesferas magnéticas com moderada hidrofobicidade/hidrofiliicidade deu a recuperação maior na atividade. Além disso, as fortes interações hidrofóbicas entre o suporte e a molécula de lipase podem interceptar a lipase próxima do suporte e ajudar a completar o processo de imobilização.

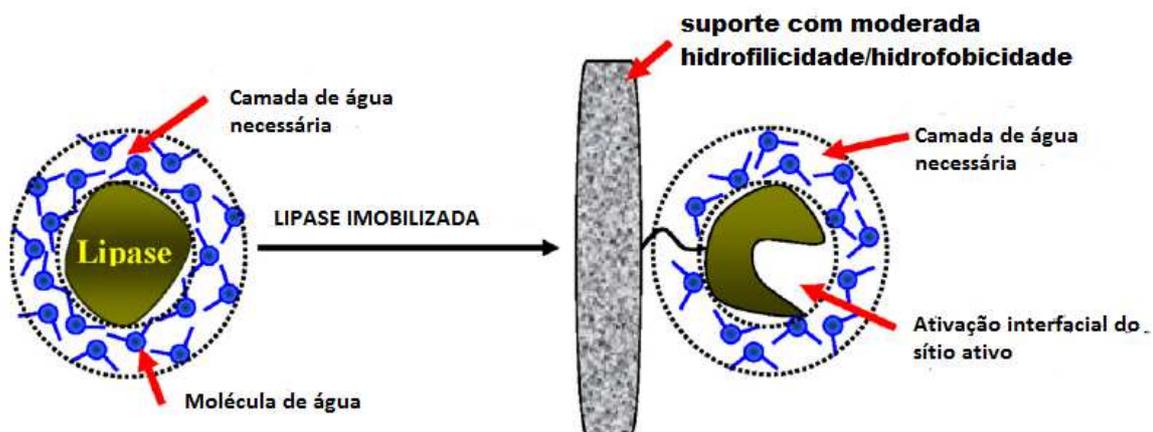


Figura 36 – Esquema da imobilização da lipase com suporte com moderada hidrofobicidade/hidrofilicidade (Zhang *et. al.*, 2012).

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

- Acrilamidometil acetato propionato de celulose (AMCAP) fornecido pela Aldrich-Sigma, massa molecular M_w , igual a 20.000 g/mol.
- Ácido acrílico 99% anidro, com densidade 1,051g/mL e ponto de fusão 13°C fornecido pela Sigma-Aldrich.
- Peróxido de hidrogênio P.A. 30% (H_2O_2), fornecido pela Vetec.
- Acrilamida (para síntese), massa molar 71,08g/mol, fornecido pela Vetec.
- Persulfato de amônia P.A. fornecido pela Vetec.
- Glutaraldeído 50% solução, fornecido pela Vetec.
- Sulfato ferroso P.A. fornecido pela Vetec.
- Cloreto de ferro III (ICO) hexahidratado P.A. fornecido pela Vetec
- Quitosana fornecida pela Sigma-Aldrich com massa molar média 161g/mol.
- Amano Lipase AK, from *Pseudomonas Fluorescens*, fornecido pela sigma-aldrich
- Todos os solventes a serem empregado serão grau PA.

3.2 – MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO AMCAP

3.2.1 – MODIFICAÇÃO POR ENXERTO DO MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO NO AMCAP

A metodologia empregada na modificação química do polímero AMCAP é realizada em duas etapas. A primeira relativa à formação da espécie radicalar, utilizando o iniciador para formar o centro ativo no monômero e a segunda o enxerto do monômero na estrutura do AMCAP. As relações molares entre o monômero AAc e a dupla ligação foram de 3:1. (Carvalho, 2008)

A modificação química em questão utiliza um iniciador redox constituído pelo par H_2O_2 e Fe^{+2} na relação molar 1/1. O radical formado a partir deste sistema reagiu com o monômero ácido acrílico formando centros ativos de natureza radicalar. Estes centros ativos enxertaram-se nas insaturações da estrutura polimérica.

O volume total contido no reator foi de 300mL e os reagentes ácido acrílico, Fe^{+2} , H_2O_2 e AMCAP estão presentes nas concentrações 0,69g/L, 2,67g/L, 0,16g/L e 32,08g/L.

A modificação química do polímero foi realizada num reator IKA-250 a 40°C (D), sob agitação contínua de 100rpm e atmosfera inerte de N_2 através de um fluxo de 60mL/min. No reator estava contida a solução aquosa de H_2O_2 (A) para que a solução de ácido acrílico e Fe^{2+} (B) seja gotejada e, após 5min do seu término, a solução do AMCAP em acetona (C) foi lentamente adicionada. Uma vez terminado, a entrada de nitrogênio foi fechada e o sistema ficou nestas condições por 2 horas sob agitação contínua (Figura 37).



Figura 37 – Reator IKA-250 existente no setor de polímeros do LAMAV.

Após a modificação química, o polímero modificado foi purificado para remover o resto de iniciador (Fe^{3+}).

3.2.2 – MODIFICAÇÃO POR ENXERTO DO MONÔMERO ACRILAMIDA NO AMCAP

A metodologia empregada na modificação química do polímero AMCAP é realizada em duas etapas. A primeira relativa à formação da espécie radicalar, utilizando o iniciador para formar o centro ativo no monômero e a segunda o enxerto do monômero na estrutura do AMCAP. A relação molar entre o monômero acrilamida e a dupla ligação foi de 3:1.

O volume total contido no reator foi de 300mL e os reagentes acrilamida, persulfato de amônia e AMCAP estão presentes nas concentrações 0,68g/L, 2,19g/L e 32,08g/L.

A modificação química do polímero ocorreu num reator IKA-250 a 40°C (D), sob agitação contínua de 100rpm e atmosfera inerte de N₂ através de um fluxo de 60mL/min. No reator estava contida a solução aquosa de PSA (A) para que a solução de acrilamida (B) seja gotejada e, após 5min do seu término, a solução do AMCAP em acetona (C) foi lentamente adicionada. Uma vez terminado, a entrada de nitrogênio foi fechada e o sistema ficou nestas condições por 2 horas sob agitação contínua (Figura 35). Após a modificação química o polímero foi levado à estufa a 40°C para secar.

3.3 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL

3.3.1 – 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 técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) foi principalmente empregada para verificar a modificação do AMCAP pelo enxerto do ácido acrílico e da acrilamida na dupla ligação, considerando os deslocamentos característicos aos prótons do ¹³C relativos a dupla ligação.

Os espectros do (acrilamidometil) acetato propionato de celulose e os polímeros modificados foram obtidos no Laboratório do Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, utilizando o aparelho Varian Mercury 300 operando a 75,4MHz para o núcleo do carbono-13, com a colaboração da Professora Maria Inês Bruno Tavares. Nos espectros do RMN-¹³C foram observados os deslocamentos que aparecem em 131 e 125ppm, que foram atribuídos a dupla ligação do AMCA. (Kumar *et al.*, 2006)

Soluções foram preparadas em acetona deuterada, medidas foram realizadas em temperatura ambiente em torno de 20°C, os deslocamentos químicos foram registrados na faixa de 0-190 partes por milhão (ppm).

Os espectros de simulação do AMCAP de partida e dos modificados foram obtidos através do programa ACD CNMR: Molecule Editor Window, para auxiliar na interpretação dos resultados.

3.3.2 – TERMOGRAVIMETRIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA

Um espectro de massas é o registro dos fragmentos de moléculas de espécies quando estas são bombardeadas em fase gasosa por um feixe de elétrons, em um equipamento chamado espectrômetro de massa. (Bart *et al.*, 1997)

Dentro do espectrômetro de massa, o íon molecular com massa/carga (m/z) é focado e transmitido por uma série de lentes eletrostáticas. O íon emitido entra em análise de massa do quadrupolo, o qual passa por um filtro específico da massa, estabilizando e transmitindo uma única massa específica e em seguida atinge o detector, ao mesmo tempo outras massas são detectadas. (Bart *et al.*, 1997)

A energia do feixe de elétrons em geral de 70eV (elétron-volts) que expulsa um dos elétrons da molécula e produz um íon positivamente carregado, chamado íon molecular.



A espécie formada não é apenas um cátion, mas, por conter um número ímpar de elétrons ele é também um radical livre (elétrons desemparelhados). O feixe de elétrons, não apenas desloca elétrons da molécula, mas produzindo íons moleculares, como também confere aos íons moleculares uma

considerável energia extra. Assim, depois de formados, estes íons moleculares se fragmentam e o modo como estes se desintegram pode fornecer informações muito úteis sobre a estrutura. (Bart *et al.*, 1997)

Os gases provenientes do processo de degradação térmica foram identificados através de um espectrômetro de massa quadrupolar Balzers ThermoStar, com faixa de massa de 1 a 200 u.m.a., na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL). Os gases foram coletados através de um capilar de quartzo acoplado na saída do analisador termogravimétrico, e conectado diretamente na fonte de íons do espectrômetro.

Uma primeira análise foi feita para identificar os produtos voláteis provenientes do processo de degradação térmica em condições dinâmicas. Neste tipo de análise, varredura de massas, é monitorada massas em toda a faixa do espectro (1 a 200 u.m.a.). A partir desta análise é feita uma análise semi-quantitativa das massas identificadas no modo de varredura de massa, em que são obtidos os espectros de intensidade de corrente iônica em função do tempo para os processos isotérmicos, em função da temperatura ou tempo para os processos dinâmicos.

3.3.3 – 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. (Souza, 2006)

Esta técnica foi empregada principalmente para acompanhar a presença dos agrupamentos alvo das modificações. A modificação do AMCAP com ácido acrílico e acrilamida separadamente, tem como alvo a dupla ligação (C=C) do

AMCAP associado ao sinal 1720cm^{-1} a qual deverá diminuir na modificação por enxerto (Silverstein *et. al.*, 2000, Kumar *et. al.*, 2006).

As amostras em forma de filme foram analisadas por transmitância. Os espectros foram obtidos em um intervalo de 4000 a 750cm^{-1} , com resolução de 1cm^{-1} e 50 acumulações por espectro.

3.4 – CRISTALINIDADE E PROPRIEDADES TÉRMICAS DOS POLÍMEROS MODIFICADOS

3.4.1 – DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Os difratogramas dos filmes da quitosana, AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm foram obtidos a partir de um difratômetro Shimadzu XRD-7000, disponível na UENF / CCT / LAMAV, equipado com raios-x de Cu K α ($\lambda = 0,1540$ nm). As varreduras foram feitas na faixa do ângulo de difração $2\theta = 2 - 40^\circ$, sendo utilizados com os seguintes parâmetros de medida de tensão de 40kv, corrente no filamento de 30mA, foi usada radiação de cobre, com velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$.

3.4.2 – CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC), TRANSIÇÃO VÍTREA

A análise de DSC foi realizada para avaliar a influência da modificação sobre a Tg em relação ao AMCAP-AAc e o AMCAP-AAm modificado. Utilizando um calorímetro da TA modelo DSC 2010 e processadas segundo software TA Advantage Speciality Lib. disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL).

As análises de DSC foram realizadas em painéis de alumínio hermeticamente fechadas com massa de polímeros de aproximadamente

14mg. Uma primeira corrida foi feita da temperatura ambiente até 210°C e mantida isotermicamente 1 minuto, com o intuito de para apagar a história térmica do polímero. Após resfriamento uma segunda corrida foi realizada desde a temperatura de 38°C até 210°C.

3.4.3 – ESTABILIDADE TÉRMICA DOS POLÍMEROS MODIFICADOS POR ANÁLISE TERMOGRAVIMÉTRICA (TGA)

A análise termogravimétrica é a técnica que acompanha a variação da propriedade física massa, da amostra em função do tempo (com a temperatura constante), ou em função da temperatura. (Cavalheiro *et. al.*, 1995)

O tipo mais comum de experimentos empregando esta técnica é aquele que se submete a amostra a uma variação constante de temperatura (controlada por um programador), em um forno, enquanto uma balança monitora sua massa. (Cavalheiro *et. al.*, 1995)

A análise termogravimétrica foi realizada para determinar a degradação térmica dos polímeros AMCAP-AAc e AMCAP-AAm. Sendo, o polímero AMCAP de partida a temperatura máxima de degradação térmica (DTG) é de 364°C e o AMCAP-AAc é de 372°C. (Carvalho *et. al.*, 2008)

Utilizando um sistema de análise termogravimétrica SDT 2960-TA Instruments, com sensibilidade na termobalança de 0,1µg, nos termopares de platina de 0,001°C, disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL). Foram utilizadas amostras de polímero de aproximadamente 10mg em panelas de platina de 90 µg. Foi utilizada uma taxa de aquecimento de 10°Cmin⁻¹, com um fluxo de 100mLmin⁻¹ de hélio, da temperatura ambiente até 900°C.

3.5 – HIDROFILICIDADE DOS SUPORTES POR ÂNGULO DE CONTATO

A hidrofobicidade do sólido pode ser medida pelo ângulo de contato, formado entre três fases em equilíbrio. Quando o sólido é totalmente hidrofóbico não há afinidade da água em sua superfície e o sólido não é molhável e o ângulo de contato se aproxima de 180° . Para sólidos hidrofílicos, ou seja, molháveis o ângulo de contato se aproxima de zero grau (Debacher, 2001). Os dois métodos mais comuns de medida de ângulo de contato são da bolha captiva e da gota séssil, respectivamente. O método mais comum de medida de ângulo de contato é o da bolha captiva. (Sellin, 2002)

No experimento da gota séssil, uma gota de um líquido puro é depositada sobre a superfície sólida através de uma micro-seringa. A gota é geralmente observada por um microscópio de baixa ampliação, e o ângulo de contato resultante, é medido através de um goniômetro, ou câmera de vídeo. Este tipo de procedimento é geralmente chamado de medida estática do ângulo de contato e é um dos métodos mais usados na medida de ângulo de contato. Esta técnica permite medidas dos ângulos de avanço (θ_a) e de retrocesso (θ_r), aumentando ou diminuindo, respectivamente, o volume da gota sobre uma superfície, como mostra a Figura 38. (Sellin, 2002)

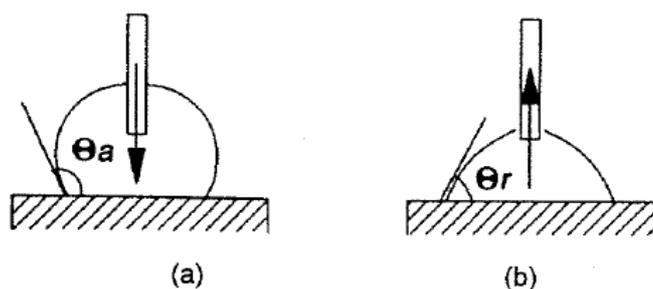


Figura 38 – Método da gota séssil: medida dos ângulos de (a) avanço e (b) retrocesso. (Sellin, 2002)

As alterações das características dos materiais obtidos quanto ao seu caráter hidrofílico serão avaliadas por medidas de ângulo de contato. Geralmente um suporte hidrofílico é o preferido para a imobilização da enzima.

Tal apoio não só maximiza a área disponível para a fixação da enzima e melhora a eficiência da imobilização, mas também a camada de água essencial que rodeia o biocatalisador e previne a diminuição da atividade catalítica (Duan *et. al.*, 2006).

A análise dos filmes de AMCAP e AMCAP-AAc foi realizada no Laboratório do Instituto de Macromoléculas Professora Eloísa Mano 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, 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. O método utilizado para medir o ângulo de contato (θ) de uma gota de um líquido sobre cada uma das superfícies das amostras do AMCAP de partida e dos AMCAP modificados em estudo foi o da gota séssil.

Os filmes foram fixados em uma lâmina de vidro por meio de fita adesiva dupla face. As lâminas foram colocadas na base do aparelho. Uma gota de água de 0,2mL foi colocada sobre a superfície da amostra com auxílio de uma seringa e a imagem da gota foi captada por uma câmera digital a intervalo de 1s. Os valores do ângulo de contato representam a média dos ângulos das 10 repetições que foram obtidos por somatória e divisão do ângulo direito e esquerdo de cada gota com a superfície do filme.

A análise dos filmes do AMCAP-AAm e quitosana foi realizada no Instituto Militar de Engenharia, com a colaboração do Prof. Carlos Nelson Elias.

3.6 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA-NÚCLEO

3.6.1 – PREPARAÇÃO DA NANO MAGNETITA (NÚCLEO)

Para a preparação das nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) foi empregado o método da co-precipitação (Bouças, 2008). No reator, sob

atmosfera de nitrogênio (E) e temperatura de 82°C (D), foram adicionados os sais de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5M e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,75M) e água deionizada, resultando num volume total de 220mL (A), com agitação de 130rpm (F) e aguardar 15min.

Fechar o nitrogênio e adicionar hidróxido de amônia 8mol/L numa relação molar de 1:8, por 10min. Após a adição, deve-se observar a mudança de cor para uma coloração escura e aumentar a temperatura a 90°C, abrir o nitrogênio por 20min. Ao término, voltar à temperatura a 82°C e adicionar uma solução aquosa 4% de ácido clorídrico até ao pH 8, em seguida, adicionar 1,9mL de tween e aguardar 5min. Por último, adicionar 83mL de ácido oléico lentamente por 20min (B). (Figura 35)

O precipitado foi isolado por decantação magnética e lavado 3 vezes com álcool etílico. Por fim, as magnetitas foram armazenadas com álcool etílico na geladeira.

3.6.2 – PREPARAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE SIMPLES EMULSÃO E COAGULAÇÃO.

Em trabalhos citados, relata estudos com partículas magnéticas com tamanhos entre 20-80nm que apresentam baixa histerese, larga distribuição de tamanho, propriedades que para utilização em um reator de leito fluidizado geraria um alto custo, com a utilização de um campo magnético maior e possibilidade de empacotamento.

O objetivo é preparar partículas magnéticas com distribuição de tamanho regular acima de 400nm, com propriedades superparamagnéticas que possibilite operar com fluxos maiores, campo magnético baixo e fácil recuperação. Propriedades que propicia sua utilização na imobilização de enzimas para obtenção de biodiesel.

3.6.2.1 – AMCAP, AMCAP-AAM E AMCAP-AAC

Previamente, foi preparada uma dispersão de magnetita (Fe_3O_4) em solução orgânica através da homogeneização de 2mL da solução dos polímeros, o puro e os modificados em tetracloreto de carbono (1%*m/v*), 0.200g de Fe_3O_4 e 0.300g de polímero. Esta mistura foi submetida ao ultra-som por um período de 10min e, posteriormente, gotejada.

As partículas foram obtidas por gotejamento, em solução de álcool polivinílico com agitação constante a temperatura ambiente. Após o gotejamento as partículas formadas foram levadas a um shaker, a temperatura de 30°C com agitação de 150rpm para as partículas não grudarem por um período de 5 horas até a volatilização do solvente e formação das microcápsulas poliméricas com o núcleo magnético. Após esta etapa, as partículas formadas foram lavadas exaustivamente e secas a temperatura ambiente.

3.6.2.2 – QUITOSANA

As micropartículas magnéticas de quitosana foram preparadas a partir de uma solução de quitosana de 2,0% (*m/m*) em solução aquosa de ácido acético 5,0% (*v/v*). Após a dissolução do material, a solução foi filtrada.

A magnetita foi dispersa na solução de quitosana (A) posteriormente gotejada através de uma agulha (B) com o auxílio de uma bomba peristáltica (C) em uma solução de NaOH 1M (D). O diâmetro das gotas foi controlado através das condições de gotejamento (viscosidade da solução, altura e velocidade de gotejamento), como mostra a figura 39. As microcápsulas obtidas foram lavadas em água destilada e em seguida levadas a estufa à temperatura de 40°C.

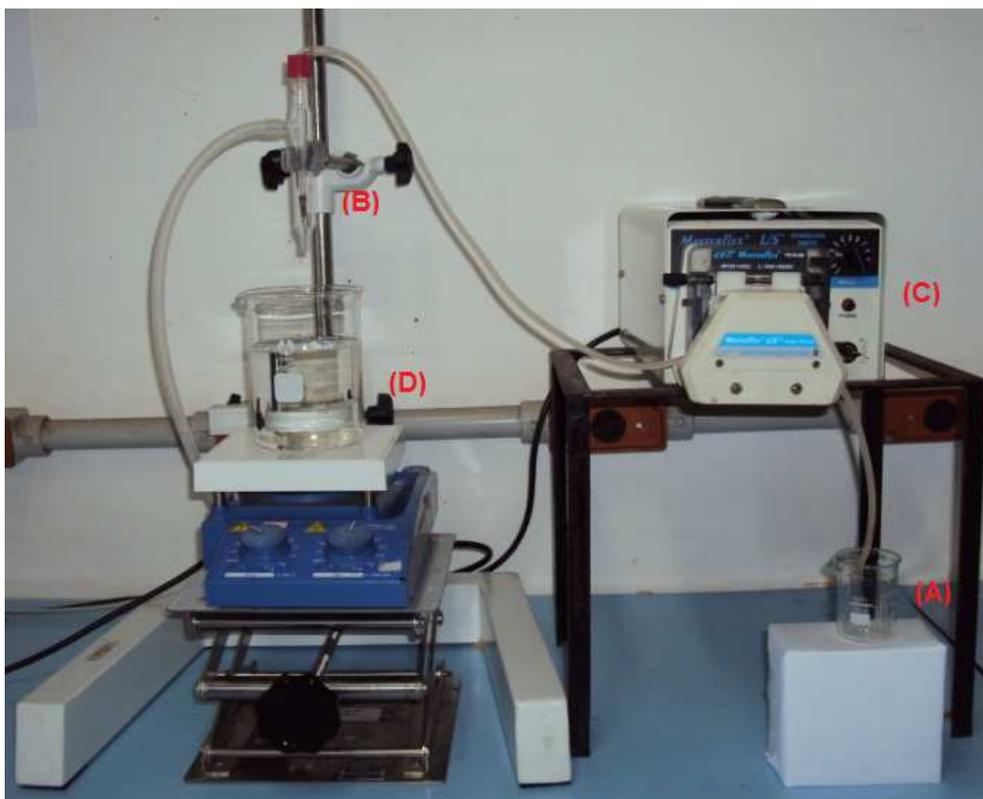


Figura 39 - Esquema da técnica de coagulação.

3.6.3 – PARTÍCULAS DE AMCAP MODIFICADAS COM ACRILAMIDA

As esferas de AMCAP-Fe₃O₄, foram modificadas com acrilamida para alterar seu balanço hidrofóbico/hidrofílico e como um suporte para que a enzima tenha uma maior mobilidade. As relações molares entre o monômero acrilamida e a esfera foi de 3:1.

O volume total contido no reator foi de 100mL e os reagentes acrilamida, persulfato de amônia e as esferas que estão presentes nas concentrações 0,28g/L, 0,88g/L e 1,5g .

A modificação química das partículas de AMCAP ocorreu num reator IKA-250 a 40°C (D), sob agitação contínua de 55rpm e atmosfera inerte de N₂ através de um fluxo de 30mL/min. No reator estava contida a solução aquosa de PSA (A) para que a solução de acrilamida (B) seja gotejada e, após 5min do seu término, e as esferas (C) foi lentamente adicionada. Uma vez terminado, a entrada de nitrogênio foi fechada e o sistema ficou nestas condições por 2

horas e 30 minutos sob agitação contínua (Figura 35). Após a modificação das esferas foi lavadas e secas a temperatura ambiente.

3.7 – CARACTERIZAÇÃO DAS PARTÍCULAS

3.7.1 – DETERMINAÇÃO DA CARGA DE MAGNETITA POR TERMOGRAVIMETRIA

A análise termogravimétrica foi realizada para determinar a carga de magnetita através da degradação do polímero, utilizando um sistema de análise termogravimétrica SDT 2960-TA Instruments, com sensibilidade na termobalança de $0,1\mu\text{g}$, nos termopares de platina de $0,001^\circ\text{C}$, disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL).

Foram utilizadas amostras de polímero de aproximadamente 10mg em panelas de platina de $90\mu\text{L}$. Foi utilizada uma taxa de aquecimento de 10°Cmin^{-1} , com um fluxo de 100 mLmin^{-1} de hélio, da temperatura ambiente até 900°C .

O gás hélio será utilizado como atmosfera inerte para evitar a ocorrência de reações de oxidação após a iniciação da degradação dos polímeros. Isto porque, o Hélio contém menos impurezas que o N_2 , que não será utilizado com gás de arraste por conter determinada quantidade de impurezas. As impurezas presentes na atmosfera de degradação poderiam promover a oxidação do polímero durante a análise mascarando os dados de variação de massa.

3.7.2 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DAS MICROPARTÍCULAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias de varredura foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura (MEV), operando com aceleração de voltagem de 25 keV, realizado na COPPE-UFRJ, das micropartículas dos polímeros modificados

para determinar sua morfologia. As micropartículas foram depositadas em porta-amostra com fita adesiva de grafite e metalizadas.

3.7.3 – 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)

A distribuição de tamanho e dimensão das micropartículas magnéticas foi determinada a partir de micrografias ópticas. O tamanho médio das micropartículas nas micrografias (3-4 micrografias, cada um contendo aproximadamente 25-50 microesferas) foi avaliado quanto ao tamanho e distribuição de tamanho.

3.7.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS FASES DO FERRO

A espectroscopia mössbauer é uma técnica utilizada para analisar o comportamento das propriedades de um núcleo atômico e do ambiente que o envolve, sendo fundamental para elucidação estrutural de compostos contendo ferro (Debrassi, 2011)

A amostra de Quitosana foi submetida à espectroscopia mossbauer, com o objetivo de caracterizar as propriedades magnéticas das nanopartículas incorporado no polímero. Foi realizada em um espectrômetro Halder MCA 3/1, em temperatura ambiente, ou seja, aproximadamente 300K, para investigação qualitativa e quantitativa dos óxidos de ferro. Foi realizada no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) com a colaboração da Professora Elisa Maria Baggio Saitovitch e da aluna de doutorado Isabel Cristina Souza Dinóla.

3.7.5 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DOS SUPORTES

Esta 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 o campo coercivo, a magnetização de saturação e a magnetização remanente das amostras.

O princípio de funcionamento do VSM está baseado na aplicação de um campo magnético uniforme, através de um eletroímã, e da leitura da resposta magnética da amostra a este campo externo. Ou seja, a amostra é fixada em uma região de campo uniforme centrada entre quatro bobinas coletoras e colocada a vibrar verticalmente. O momento magnético induzido na amostra causa uma variação no fluxo de campo magnético que flui através das espiras, induzindo nas bobinas coletoras uma força eletromotriz. O valor da magnetização é obtido da força eletromotriz medida. Para a obtenção do ciclo de histerese o campo magnético é variado lentamente e a leitura da magnetização é feita para cada valor do campo magnético externo.

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 – IMOBILIZAÇÃO DAS ENZIMAS, POR LIGAÇÃO COVALENTE

3.8.1 – ATIVAÇÃO COM GLUTARALDEÍDO

Os suportes foram embebido em solução de glutaraldeído 8% (v/v) e em solução tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7, na proporção 1:500, 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. A figura 40 sugere o esquema proposto para a modificação das partículas com glutaraldeído.

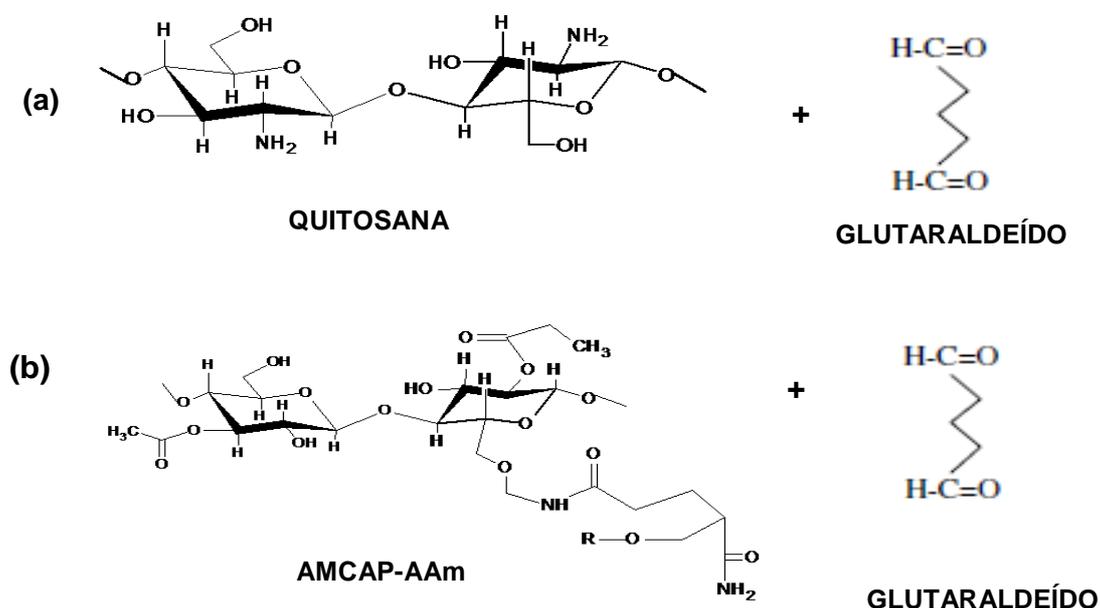


Figura 40 - Esquema proposto para a modificação das micropartículas com glutaraldeído

Estudou-se a ativação dos suportes com glutaraldeído, segundo metodologia proposta por Gonçalves e seus colaboradores. Nesta ativação, glutaraldeído reage com os grupos amino presentes nos suportes, a fim de torná-los aptos para as etapas posteriores (continuidade das ativações ou imobilização da enzima).

O suporte foi embebido em solução de glutaraldeído de diferentes concentrações 2,5%, 5% e 8% em tampão fosfato de sódio 0,1M em pH 7, sendo mantido em um shaker com agitação e temperatura de 30°C por 3, 5 e 6 horas. Após o tempo de reação, as esferas foram lavadas três vezes com tampão e água destilada e levadas a estufa a temperatura de 50°C por 18 horas. Para investigar o tratamento do suporte ativado, foi realizada a análise de FTIR.

Os espectros de FTIR têm sido amplamente utilizados como uma ferramenta para identificar a presença de certos grupos funcionais ou ligações químicas em modificações de materiais, pois cada substância química específica, muitas vezes mostra uma banda de absorção de única energia. (Gonçalves *et. al.*, 2012).

Foi utilizado como objetivo de examinar a característica das estruturas químicas dos três tipos de esferas ativadas com glutaraldeído, para determinar a concentração adequada de glutaraldeído a ser utilizada na imobilização covalente da enzima Amano Lipase AK.

A reticulação química do suporte com o glutaraldeído ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amina ($-NH_2$) e a ligação $C=N$ ($\sim 1648cm^{-1}$), base de Schiff. E em ($\sim 1558cm^{-1}$) associada á ligação amina ($-NH_2$). (Mansur *et. al.*, 2008)

As amostras foram analisadas por pastilhas de KBr, os espectros foram obtidos em um intervalo de 4000 a $400cm^{-1}$, com resolução de $2.0cm^{-1}$ e 50 acumulações por espectro.

3.8.4 – IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR LIGAÇÃO COVALENTE

3.8.4.1- DETERMINAÇÃO DA PROTEÍNA

O método para a determinação da lipase para imobilização foi o de Bradford modificado. O método baseia-se na conversão do corante Coomasse Brilliant Blue BG-250 numa forma azul intensa, quando o ânion do corante interage com grupos NH_3^+ das proteínas.

A solução enzimática (5mg/mL de lipase) foi primeiro sonicada 10x de 30s e centrifugada por 10min, 8000rpm a temperatura de $25^\circ C$ na centrífuga Hettich-Zentrifugen Universal 320R.

Foi feita uma curva padrão com BSA (1mg/mL) com alíquotas de 2 μ L a 20 μ L, foram retiradas alíquotas de 2,5 e 10 μ L da solução enzimática, para todos foi completado o volume para 200 μ L com água e adicionou 1mL de Bradford e um branco foi utilizado.

Em uma placa de Elisa, foi adicionado 350 μ L das amostras em triplicata e lida a absorbância em 600nm. A quantidade de proteína foi então estimada plotando as leituras de absorvância referentes à curva padrão, que foi utilizado para determinar a proteína em amostras desconhecidas.

3.8.4.2 – IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE

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 200mg 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 lípase 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 imobiliza dos foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato.

Após o processo de imobilização a atividade das partículas e as massas enzimáticas e lavadas foram mensurada segundo a metodologia descrita para determinação da atividade enzimática, com o objetivo de se conhecer a concentração de lipase AK imobilizadas nas esferas de quitosana dos AMCAP-modificados.

3.9 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA

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 Castro et. al., 1999, Pereira et. al., 2010, Orrego et. al., 2010, Cetinus et. al., 2007, Tan et. al., 2010, Li et. al., 2010. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μ mol de ácido graxo por minuto de reação.

Emulsão: 25mL de azeite de oliva e 75mL de goma arábica a 3%*m/m*. Em frascos de 125mL foram adicionados: 5 mL da emulsão e 2 mL de tampão fosfato de sódio 0,1M pH 7.0. A fim de garantir homogeneização do meio, o sistema reacional foi mantido sob agitação (160rpm) a 40°C por 5 minutos. Em seguida adicionou-se o suporte imobilizado, a solução enzimática, a solução da enzima livre e a solução lavada em duplicata, que ficou sob agitação de 160rpm durante o tempo de 5 minutos determinado para a reação. Após o período de incubação, a reação foi paralisada pela adição 10 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1).

Em seguida cada solução foi agitada com um ultra-turrax com velocidade de 8000rpm e centrifugada por 10 minutos com velocidade de 4000rpm. Foi retirada de cada solução 10mL para titulação direta. A solução foi titulada utilizando 2 gotas do indicador fenolftaleína, com o auxílio de um agitador magnético, no pipetador para a titulação foi adicionado a solução de NaOH 0,1M. O volume gasto foi anotado para a realização dos cálculos.

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

Onde:

- M = concentração molar da solução de NaOH;
- m = massa da enzima em gramas;
- t = tempo de reação em minutos;
- V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);
- V_b = volume de NaOH gasto na titulação do controle (mL).

CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - INTRODUÇÃO

O foco do trabalho é a modificação de derivados dos polissacarídeos celulose e quitina com o objetivo de desenvolver suportes com propriedades magnéticas para a imobilização da Lipase em ambientes diferentes (balanço hidrofóbico/hidrofílico).

Os derivados celulósicos com a estrutura básica do AMCAP e a quitosana devem propiciar superfícies com ambientes e distanciamento das enzimas imobilizadas diferentes o que deve influenciar na conformação da enzima e conseqüentemente em sua atividade (Duan *et. al.*, 2006; Tan *et. al.*, 2010 e Zhang *et. al.*, 2012)

4.2 – MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO AMCAP

4.2.1 – ENXERTO DO MONÔMERO ÁCIDO ACRÍLICO NO AMCAP

O processo de modificação foi realizado por enxerto do monômero ácido acrílico (AAC) na dupla ligação do AMCAP (figura 41) através do mecanismo de enxerto discutido em trabalhos anteriores (Carvalho *et. al.*, 2010).

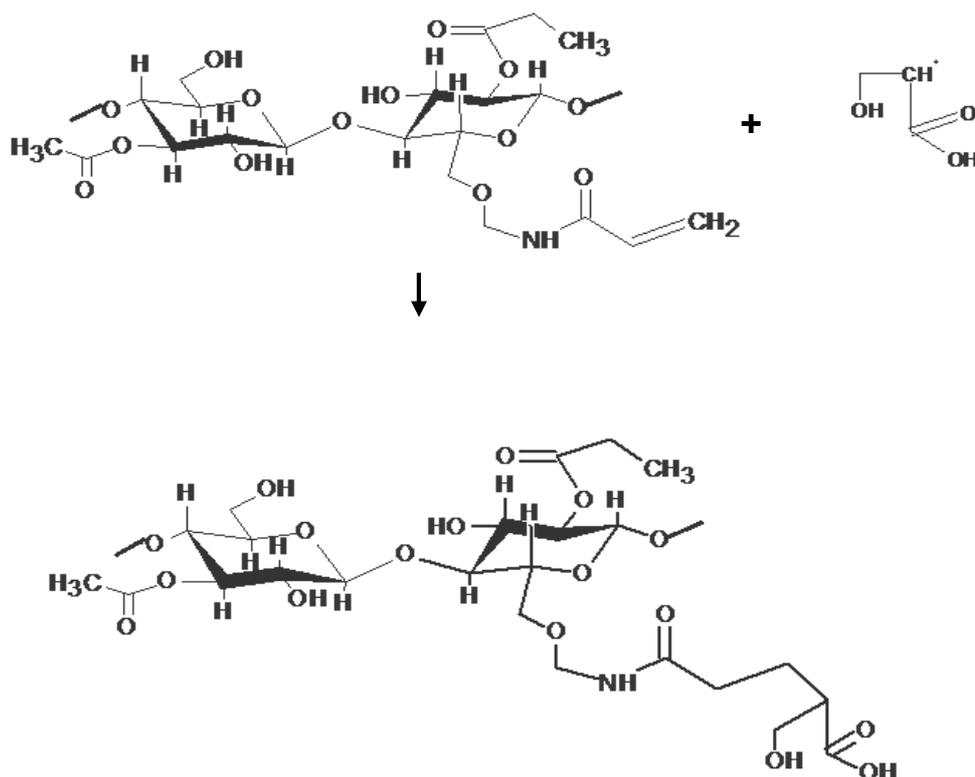


Figura 41 - Modificação do AMCAP por enxertia do ácido acrílico.

4.2.2 – ENXERTO DA ACRILAMIDA NO AMCAP

A modificação do AMCAP com o monômero acrilamida (AAm) foi realizado utilizando um procedimento similar ao utilizado com ácido acrílico. O iniciador utilizado para formar o centro ativo no monômero acrilamida (figuras 42 e 43) foi o persulfato de amônia (Hosseinzadeh, 2012).

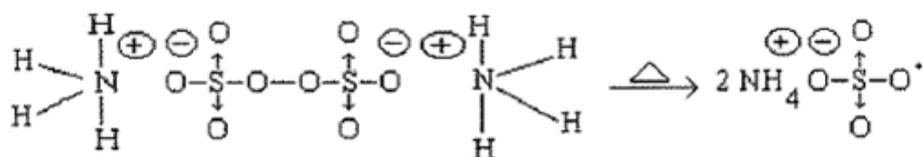


Figura 42 – Reação do PSA para gerar o radical ânion sulfato. (Baltieri, 1996)

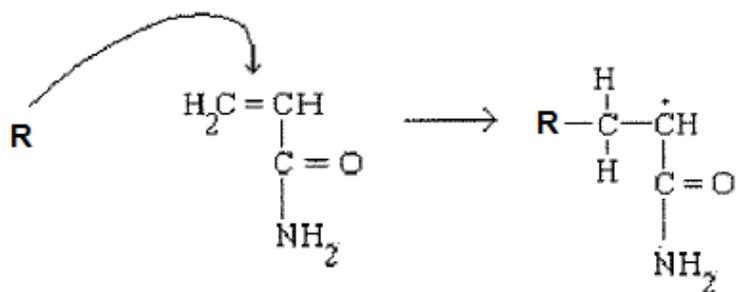


Figura 43 – Formação do centro ativo na acrilamida.

O radical ânion persulfato (R) se adiciona ao carbono mais hidrogenado da dupla ligação (Regra de Markovnikov) do monômero que posteriormente se enxerta na estrutura do AMCAP por adição a dupla ligação do AMCAP (Figura 44). (Allinger, et, al., 1976)

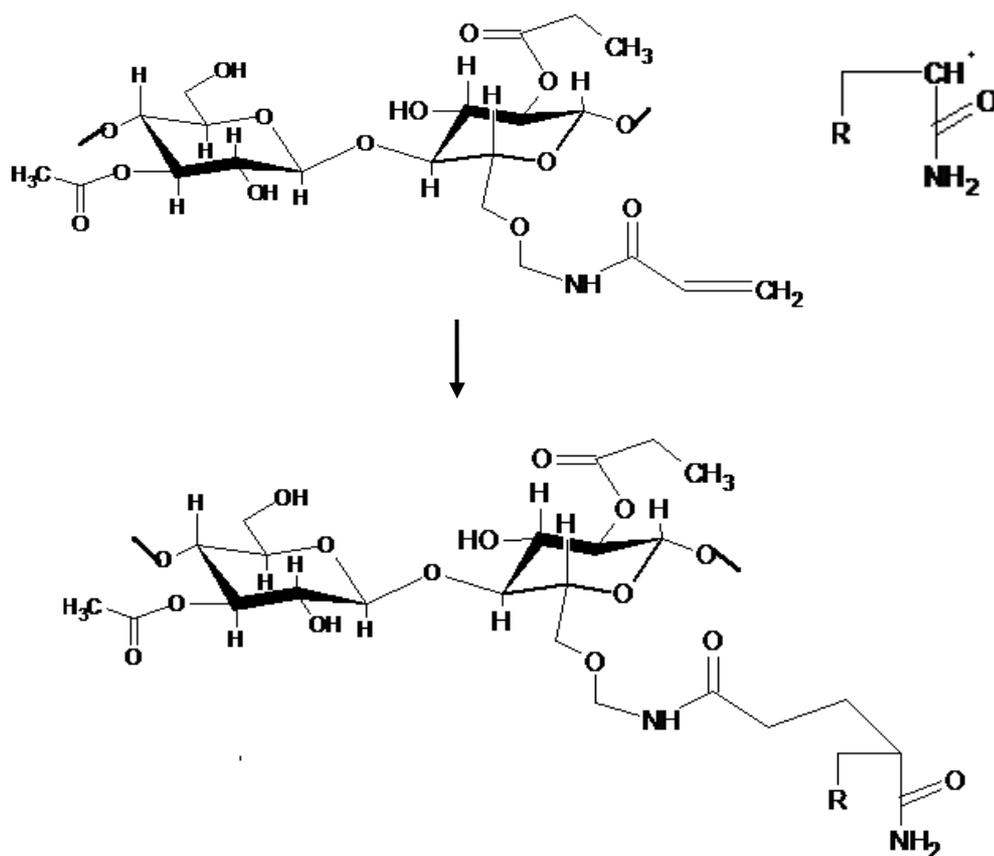


Figura 44 - Esquema da estrutura do polímero AMCAP modificado com o monômero acrilamida.

4.3 - ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

A espectroscopia de infravermelho foi utilizada para acompanhar as mudanças no sinal da absorção relativa ao “estreitamento” da dupla ligação, alvo de modificação na estrutura do AMCAP (Figura 47)

A modificação por enxerto na dupla ligação do AMCAP os monômeros originam uma diminuição na absorbância dos agrupamentos C=C a 1683cm^{-1} (figuras 45 e 46) (Silverstein, 2000, Kumar *et. al.*, 2006).

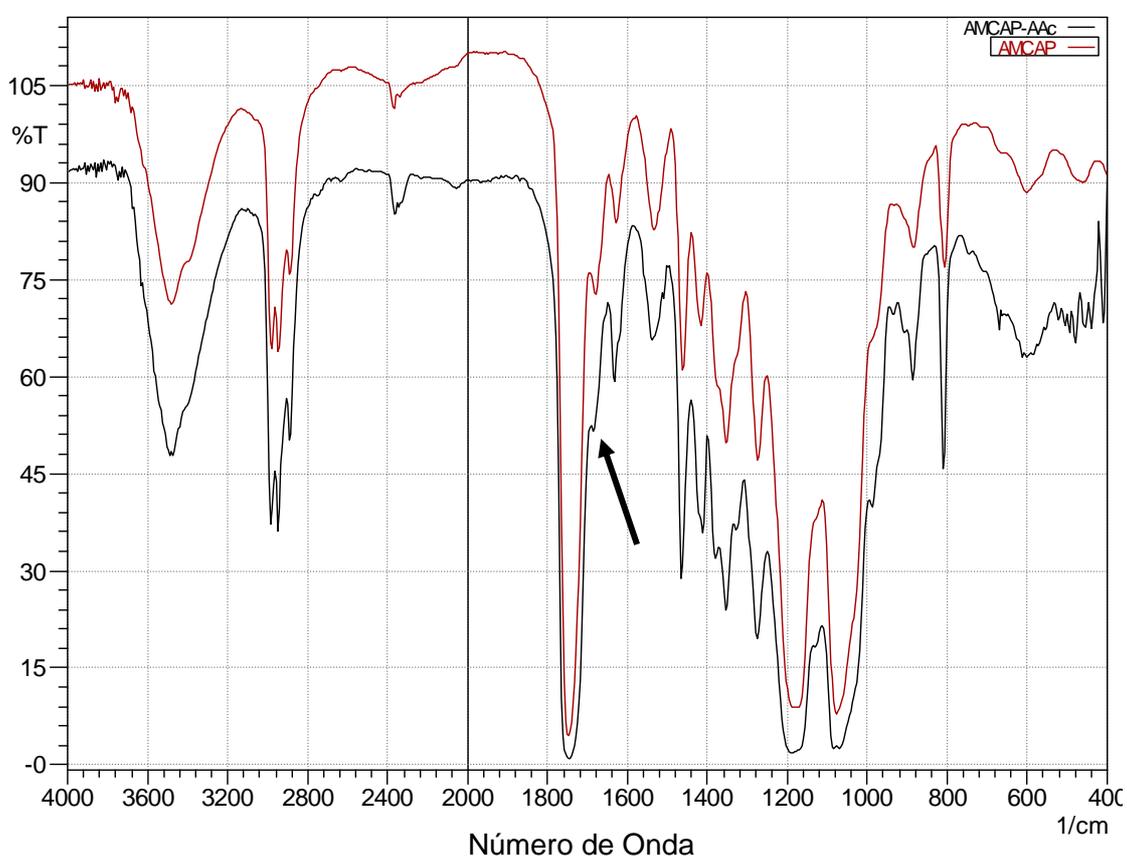


Figura 45 - Espectros de FTIV do AMCAP e do AMCAP-AAc.

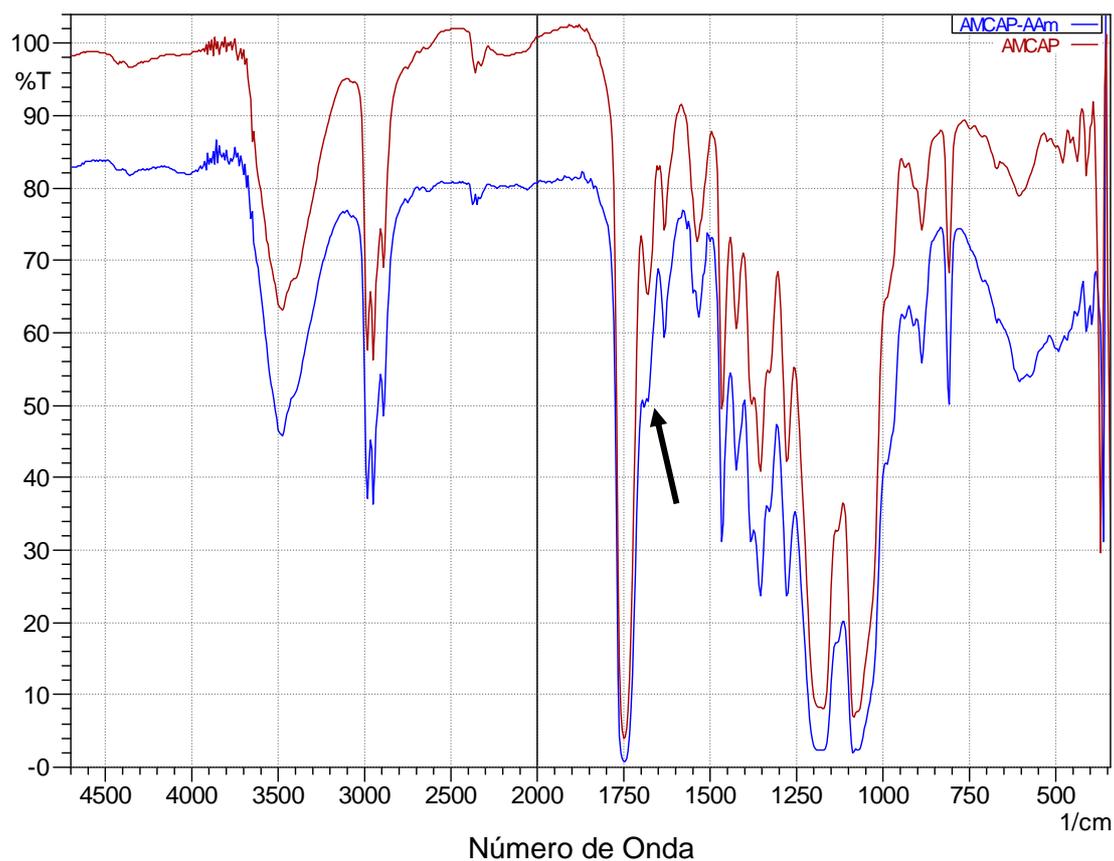


Figura 46 - Espectros de FTIV do AMCAP e do AMCAP-AAm.

Uma análise das variações observadas na intensidade dos agrupamentos C=C foi realizada considerando as intensidades relativas do sinal de absorção intensa a 2983cm^{-1} associada aos agrupamentos metila ($-\text{CH}_3$), que permanecem sem alteração na estrutura do AMCAP.

A relação entre as intensidades $I_{\text{C=C}}/I_{\text{CH}_3}$ para o AMCAP é 0,75, entretanto para o AMCAP-AAc e o AMCAP-AAm esta relação diminui sendo 0,67 e 0,69 respectivamente indicando que existe uma menor quantidade de duplas ligações na estrutura dos polímeros modificados com os monômeros ácido acrílico e acrilamida.

4.4 – CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DO AMCAP MODIFICADO

4.4.1 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR DO ^{13}C (RMN).

O polímero de partida AMCAP (figura 47) foi caracterizado em solução com o auxílio da técnica de RMN ^{13}C .

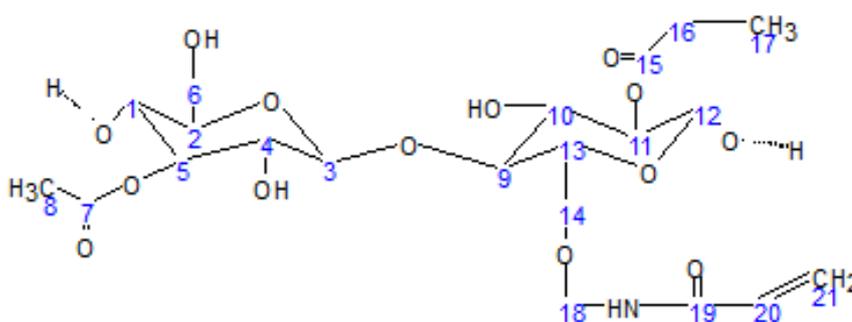


Figura 47 – Estrutura do (acrilamidometil) acetato propionato de celulose AMCAP.

O espectro (figura 48) os sinais alvo da modificação são as da dupla ligação observadas a 126 e 132ppm.

Assim como os sinais das carbonilas provenientes tanto dos agrupamentos acetatos e propionato localizados entre 160 a 180ppm como a da carbonila amídica em posição alfa a dupla ligação (C19) em 166ppm. Estes sinais são observados no trabalho de Kumar a 167ppm para o AMCA e no trabalho de Carvalho a 168ppm.

Kumar e colaboradores (2006) reportaram os deslocamentos dos sinais dos carbonos da dupla ligação a 125 e 131ppm e 167ppm para a carbonila amídica para o polímero acrilamidometil acetato de celulose (AMCA) e Carvalho e colaboradores (2010) em 129 e 131ppm para a dupla ligação do AMCAP e 168ppm para a carbonila amídica.

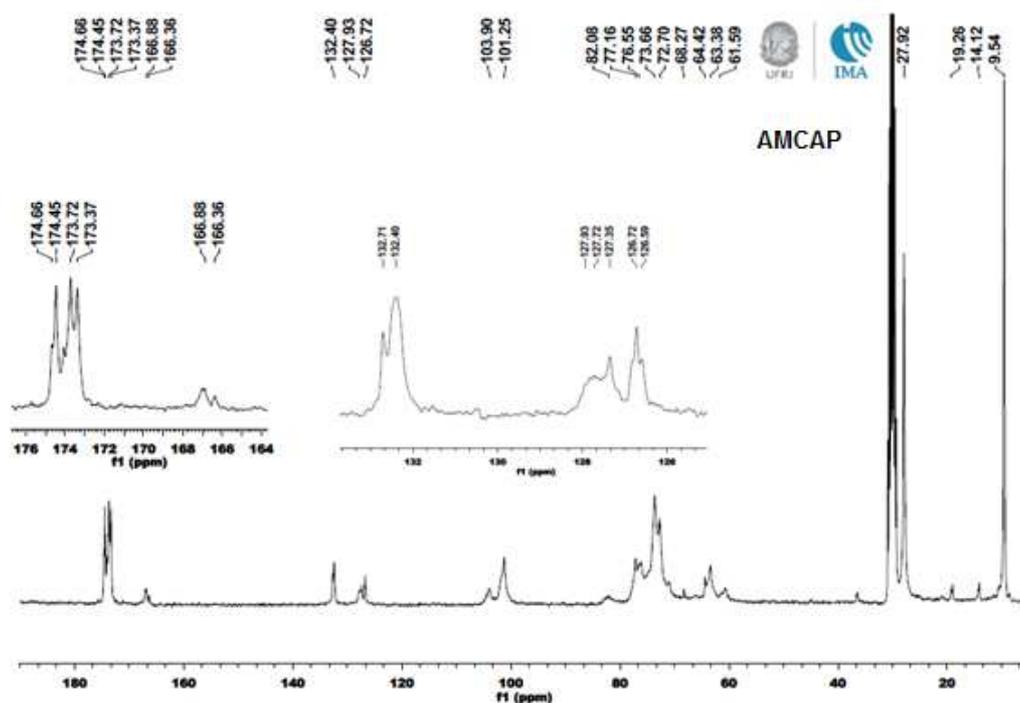


Figura 48 - Espectro do RMN- ^{13}C do AMCAP de partida.

Estes deslocamentos podem ser identificados com o auxílio do programa de simulação CNMR Molecule Editor Window (figura 49).

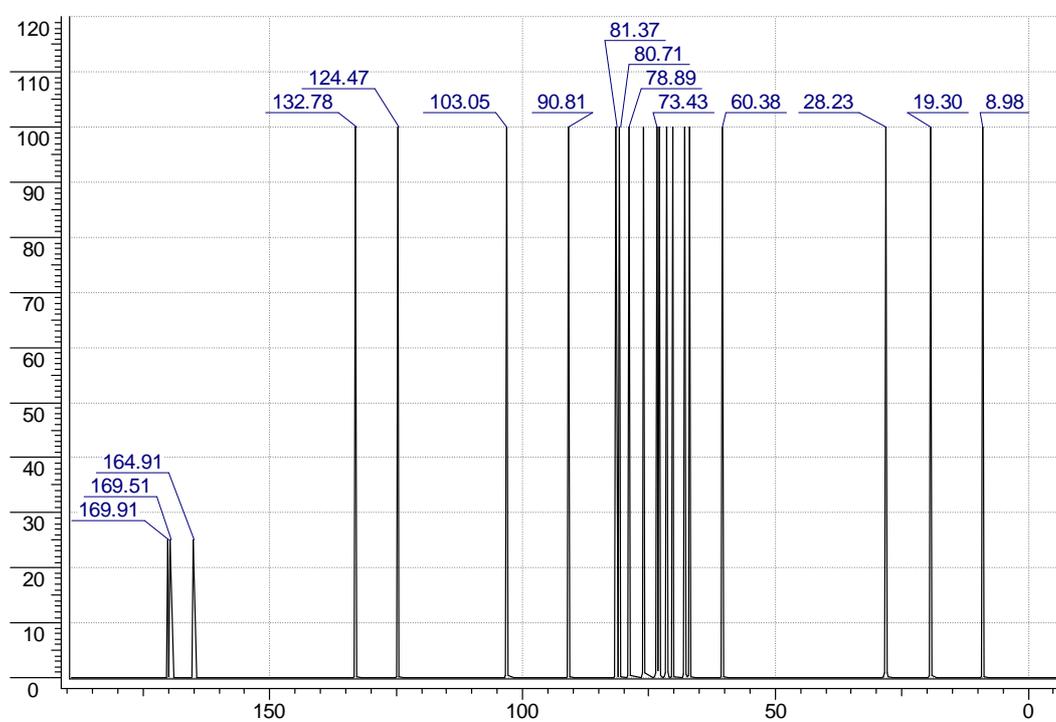


Figura 49 - Simulação do espectro RMN- ^{13}C do AMCAP de partida.

A modificação da dupla ligação utilizando o ácido acrílico deve originar uma modificação dos sinais associada aos carbonos C(20), C(21) e C(19) no polímero. O espectro (figura 50) do AMCAP após o processo de modificação no qual existe a adição a dupla ligação do ácido acrílico se observa uma discreta diminuição das intensidades relativas aos carbonos C(20), C(21) em relação ao polímero (AMCAP) não modificado.

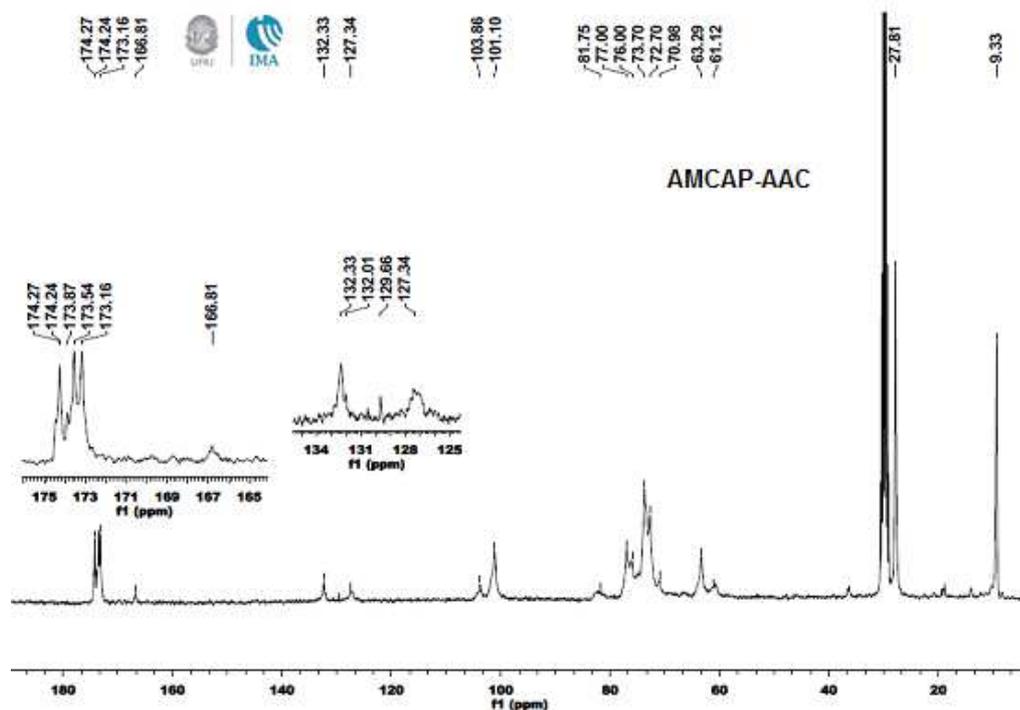


Figura 50 - Espectro do RMN-13C do AMCAP modificado com o monômero ácido acrílico (AMCAP-AAc).

O sinal C(19) do grupo carbonila em posição alfa a dupla ligação (C20-C21) (166 ppm), (Figura 50) desaparece e as intensidades dos sinais 173.54 a 174.27ppm diminuem em relação ao sinal 173.16ppm.

A simulação da estrutura modificada pela adição do ácido acrílico, considerando apenas uma unidade estrutural e sem considerar o efeito do solvente, nos permite associar de forma aproximada, as alterações observadas no espectro (figura 52) as modificações possíveis da estrutura do AMCAP-AAc (Figura 51).

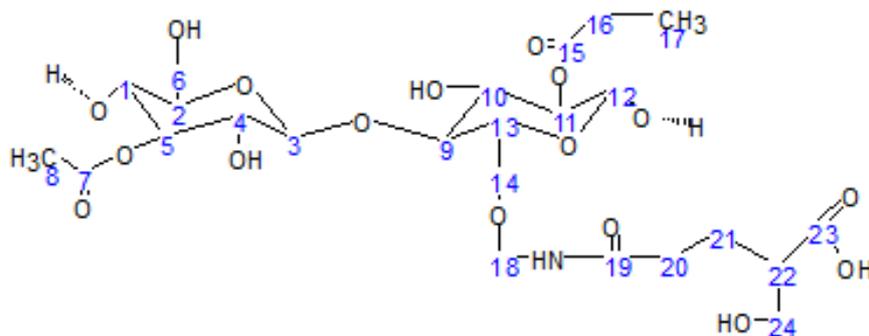


Figura 51 – Estrutura do AMCAP modificado com o ácido acrílico (AMCAP-AAc).

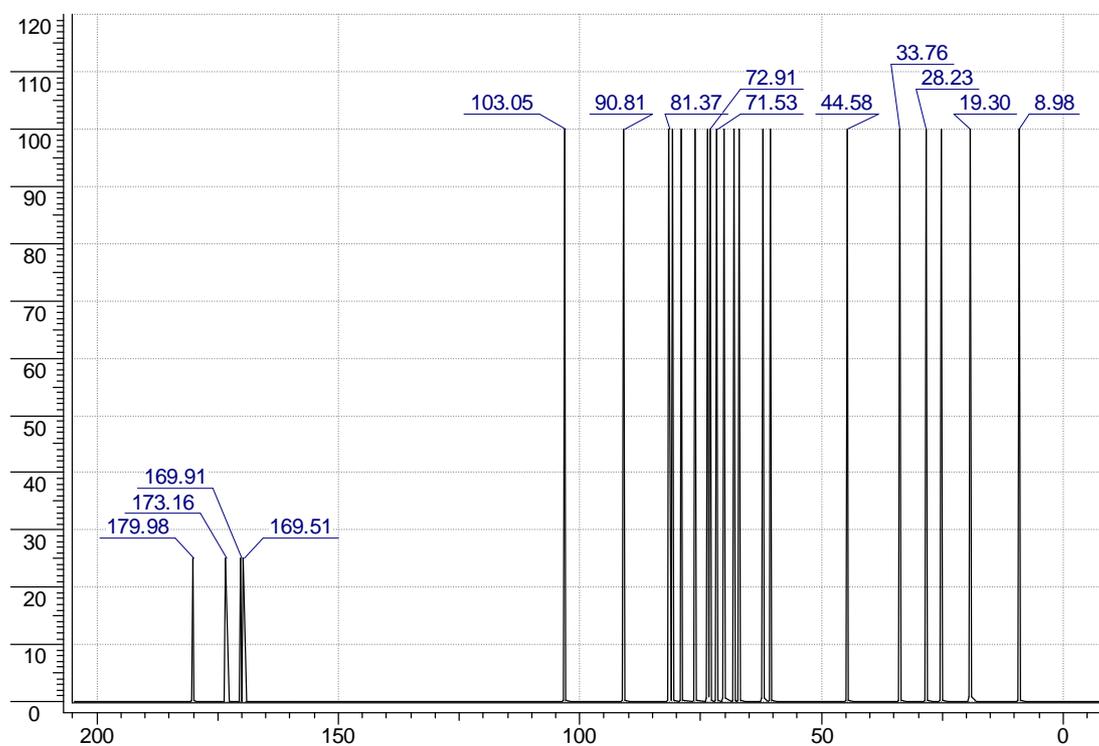


Figura 52 - Simulação do espectro RMN-13C do AMCAP-AAc.

A modificação da dupla ligação por enxerto do AAc, altera o sinal referente aos carbonos da dupla ligação no espectro (figura 52) simulado. No espectro simulado do AMCAP a carbonilase se encontra localizada na posição alfa, identificada como (C19) a 166ppm, e no AMCAP-AAc aparece a 174ppm.

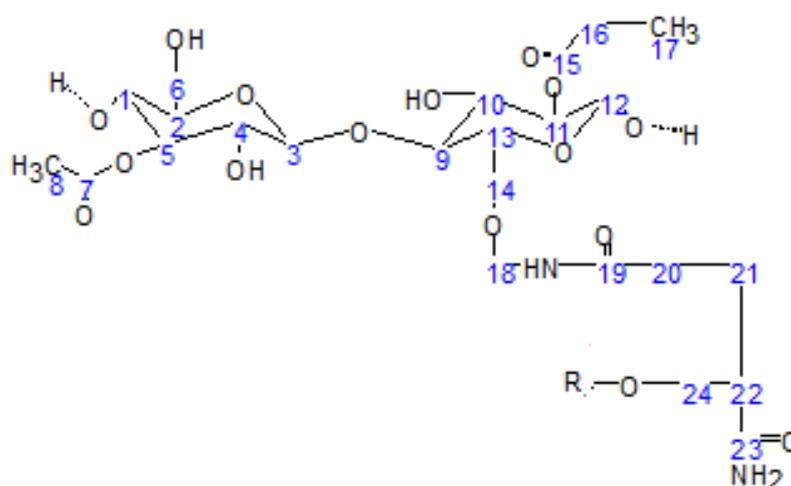


Figura 53 – Possível estrutura do AMCAP modificado com o monômero acrilamida (AMCAP-AAm).

A modificação da dupla ligação com o monômero acrilamida utilizando como iniciador (persulfato de amônia), deve originar o enxerto no monômero acrilamida (figura 53), o que foi caracterizado, também, com o auxílio da técnica de RMN ^{13}C em solução.

No espectro de RMN de ^{13}C do AMCAP modificado com o monômero acrilamida (Figura 54) observar-se que os sinais a 126 e 132ppm identificados no AMCAP como os C(20)-C(21) da dupla ligação diminuem de intensidade, entretanto neste espectro aparecem dois sinais próximos a 130 e 129ppm, estes sinais são de dupla ligação, pode ser de parte que não reagiu ou de outro grupo semelhante que possa ter sido formado.

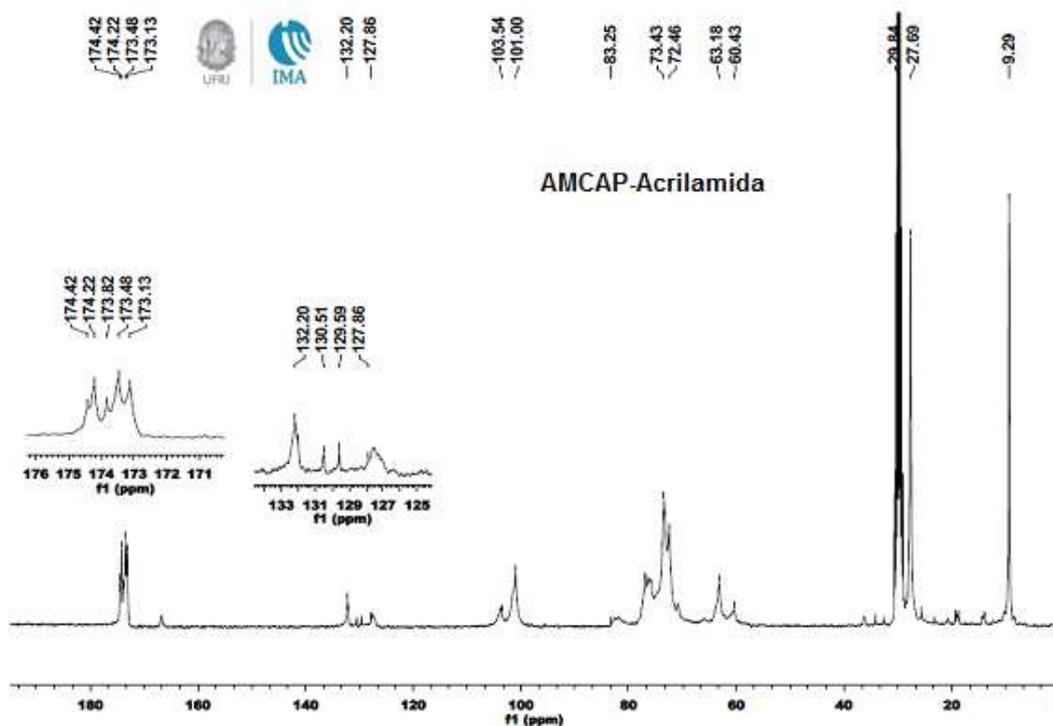


Figura 54 - Espectro de RMN de ^{13}C em solução do AMCAP modificado com o monômero acrilamida (AMCAP-AAm).

A região dos carbonos dos agrupamentos carbonila (160-180ppm) apresenta uma discreta modificação principalmente na relação de intensidades.

Na região entre 60-40ppm se observa também modificação em relação ao AMCAP. No caso de modificação, o sinal devido ao C(24) que no espectro deve sofrer alteração devido ao resíduo de iniciador acoplado a este carbono como observado no espectro simulado para esta estrutura (Figura 55).

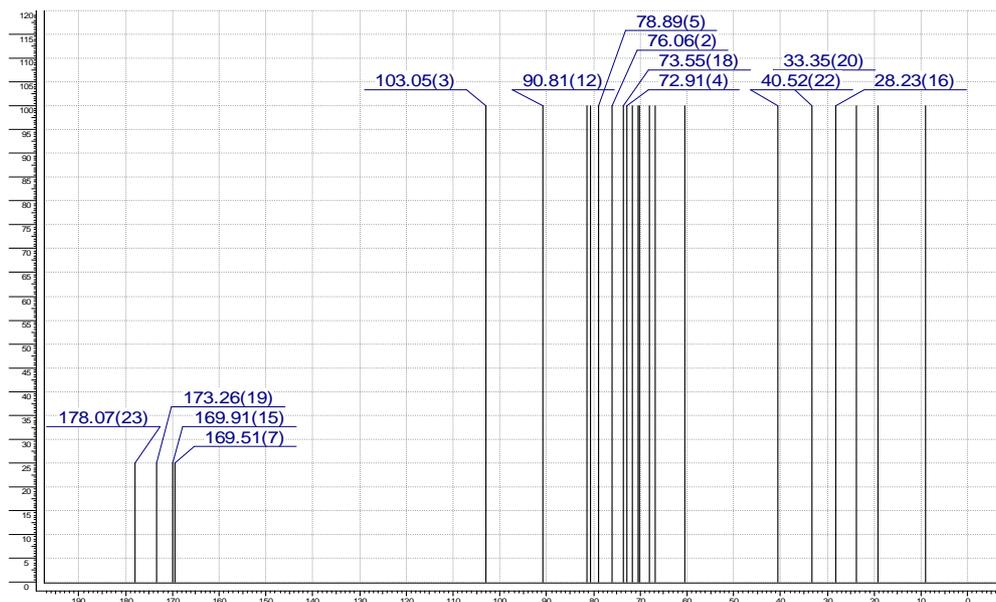


Figura 55 - Simulação do espectro RMN-¹³C do AMCAP-AAm modificado.

4.4.2 - TERMOGRAVIMETRIA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSA (TGA/MS).

A técnica acoplada TGA-MS foi utilizada para identificar a presença dos monômeros enxertados nas estruturas do AMCAP-AAc e AMCAP-AAm.

A utilização desta técnica considerou que proporciona limitação devido a que os fragmentos a serem analisados não são fragmentos diretos, provenientes apenas da quebra das ligações covalente da estrutura do polímero objeto de estudo, sendo que também são provenientes de processos de recombinação e reordenamento que se originam logo após a formação do fragmento no forno do sistema termogravimétrico TGAQ5000. Sendo assim o estudo comparativo dos fragmentos detectados permite estabelecer diferenças entre o AMCAP sem modificar e modificado.

Em trabalhos anteriores (Carvalho, 2008) foram analisado as diferenças encontradas no padrão de fragmentação a 298°C do AM AP-AAc em relação ao AMCAP. Para este polímero modificado (AMCAP-AAc) observaram dois sinais relativos ao fragmento m/z 29. Um sinal de menor intensidade que parece estar

associada a modificação estrutural originada com a adição do ácido acrílico e a segunda devida aos agrupamentos acetatos e propionatos da estrutura celulósica principal. A principal diferença deste polímero AMCAP foi o sinal m/z 40, de marcada intensidade no polímero modificado por enxerto do ácido acrílico.

O derivado celulósico AMCAP foi também modificado no presente trabalho utilizando uma metodologia similar de enxerto utilizando neste caso a acrilamida. O estudo do processo de fragmentação térmica deste polímero modificado também apresenta diferenças com a fragmentação do AMCAP.

A figura 56 permite destacar estas diferenças em particular na detecção dos fragmentos com relação a m/z 29, 40, 56, 71 e 73 para os polímeros modificados e o AMCAP.

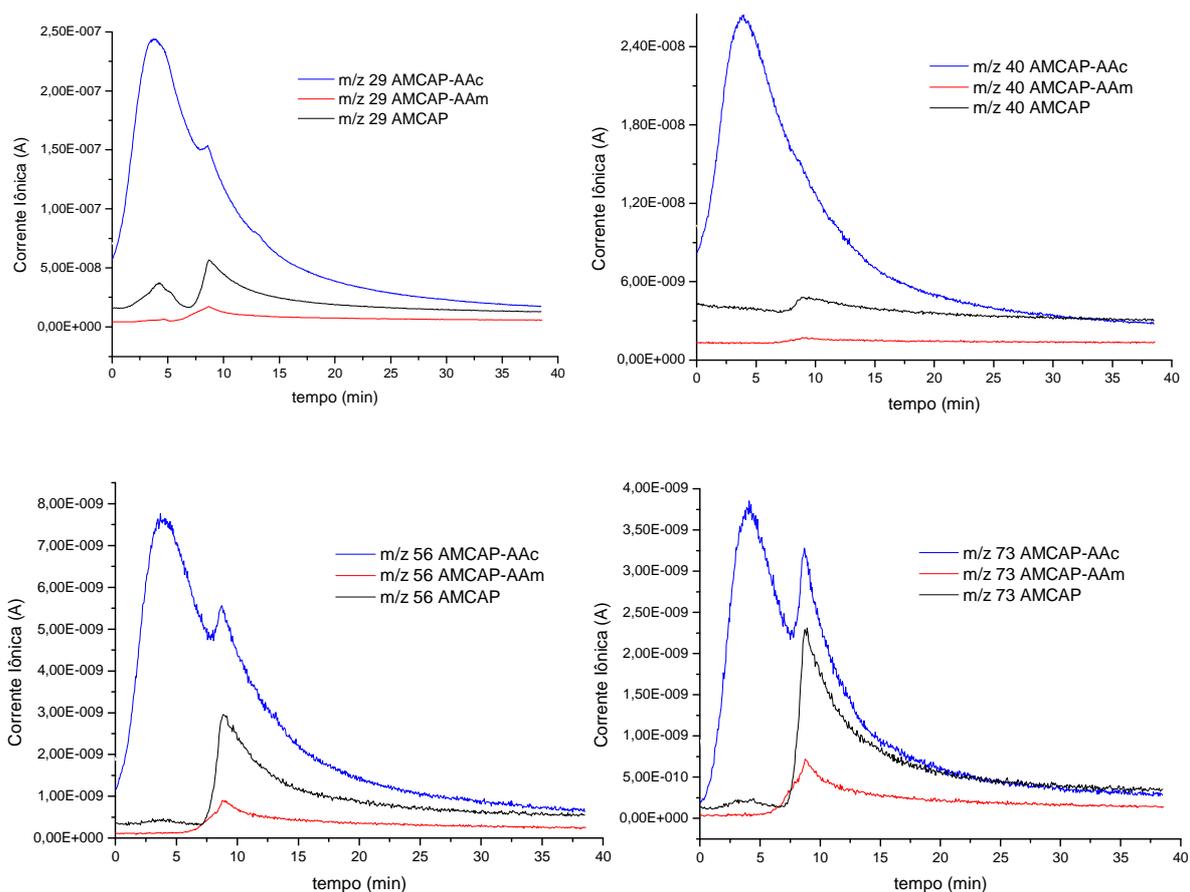


Figura 56 - Espectro de massa do AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm.

Analisando os processos de fragmentação ocorrido nos polímeros AMCAP-AAc, AMCAP-AAm e no AMCAP (figura 56) é possível confirmar a existência de diferenças que podem vir a justificar as modificações pretendidas utilizando os monômeros ácido acrílico e acrilamida para originar o enxerto na cadeia lateral do AMCAP.

Tanto para o AMCAP-AAc como para o AMCAP existem dois máximos de corrente iônica aproximadamente a 5 e 10 minutos relativos as relações m/z 73 e 56. Em particular o fragmento originado a menor tempo, provavelmente provenientes de fragmentos com m/z 73, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$ e $\text{NHCOCH}_2\text{CH}_3$ para o AMCAP-AAc e AMCAP não é detectado para o AMCAP-AAm.

Um comportamento similar é observado para o fragmento com m/z 56 que se registra próximo a 5 minutos e que deve estar associado a perdas $\text{C}_2\text{H}_2\text{CO}$ no AMCAP e AMCAP-AAc não detectadas para o AMCAP-AAm.

Estes resultados complementam os indícios de modificação encontrados pela técnica de RMN- ^{13}C principalmente considerando que o enxerto foi realizado apenas numa fração de insaturações terminais da cadeia lateral do AMCAP.

4.4.3 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DOS POLÍMEROS AMCAP, AMCAP-AAc, AMCAP-AAM E QUITOSANA

A celulose apresenta interações secundárias entre as cadeias poliméricas do tipo ligações de hidrogênio e força de van der Waals que favorecem a formação da fase cristalina. De acordo com Bommarius e seus colaboradores (2010) dois picos, um com intensidade máxima em $2\theta=22,5^\circ$ e outro com intensidade mínima em $2\theta=18^\circ$, são observados no difratograma de difração de raios-x de fibras de celulose.

Pode ser observado na Figura 57 que a inserção dos grupos lateral ácido acrílico e acrilamida no AMCAP modificam pouco o padrão de difração do AMCAP. Se observa um ligeiro deslocamento para ângulos de difração 2θ

menores nos dos polímeros, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm e mudanças na área associadas a cada polímero. O AMCAP-AAc apresenta um decréscimo na cristalinidade entre tanto o AMCAP-AAm aumenta sua cristalinidade em relação ao polímero antes de originar-se o enxerto dos monômeros.

O difratograma do filme de quitosana (Figura 58) apresenta no eixo 2θ sinais a 10° , 20° (Santos, 2009) associadas a região o cristalina.

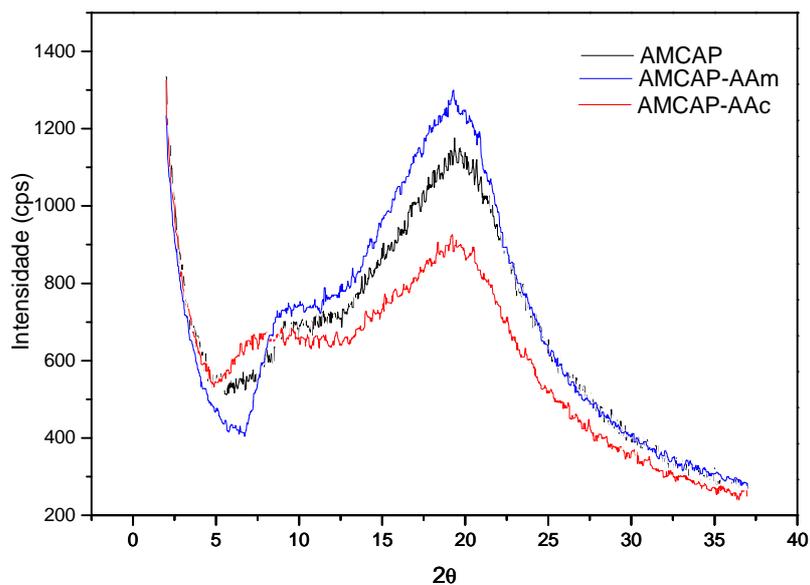


Figura 57 - Difratograma de raio-X do AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm.

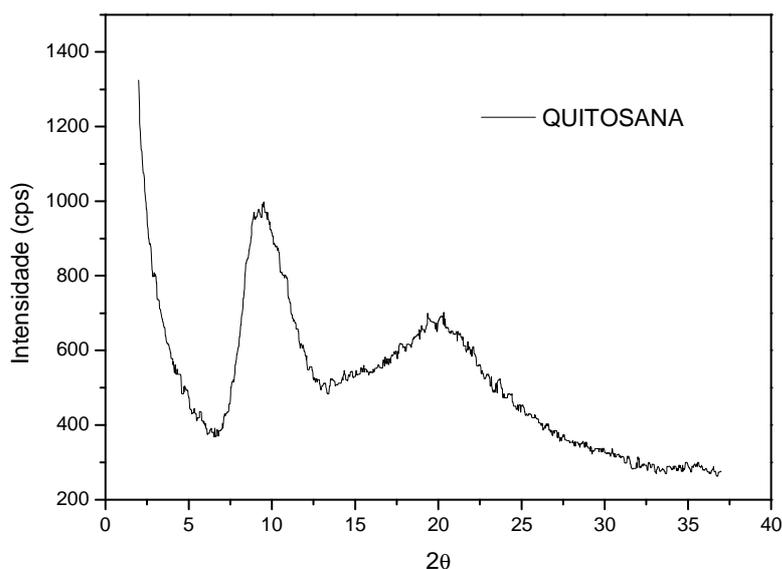


Figura 58 - Difratograma de raio-X da quitosana.

Nesta faixa para 2θ entre 10° - 40° , a tendência a formação de bandas largas em lugar de sinais finos são consequência da fase amorfa, originando um difratograma característico de um polímero semicristalino (Svetlana, 2008).

Os polímeros celulósicos (AMCAP) e a quitosana (CS) apresentam uma relativa alta cristalinidade que no caso particular dos suportes biocatalíticos pode vir a gerar uma maior resistência das micropartículas no reator catalítico.

4.5 – PROPRIEDADES DOS POLÍMEROS UTILIZADOS COMO SUPORTES

4.5.1 - CALORIMETRIA DIFERENCIAL EXPLORATÓRIA (DSC)

As modificações realizadas na estrutura celulósica do AMCAP devem originar mudanças no comportamento térmico deste polímero. Estas mudanças foram analisadas com a técnica de calorimetria diferencial de varredura (DSC).

Carvalho e seus colaboradores (2008) realizaram um estudo sobre a modificação do AMCAP-AAc com concentração de 3:1 em relação à dupla ligação da estrutura do AMCAP que foi avaliada observando a T_g do AMCAP-AAc sendo 153°C bem superior ao AMCAP de partida 135°C , comprovando a modificação com concentração maior do iniciador/monômero

As curvas calorimétricas (figura 59) do polímero de partida (AMCAP) e dos polímeros modificados por enxerto no presente trabalho apresentam diferenças significativas nas temperaturas de transição vítrea (T_g).

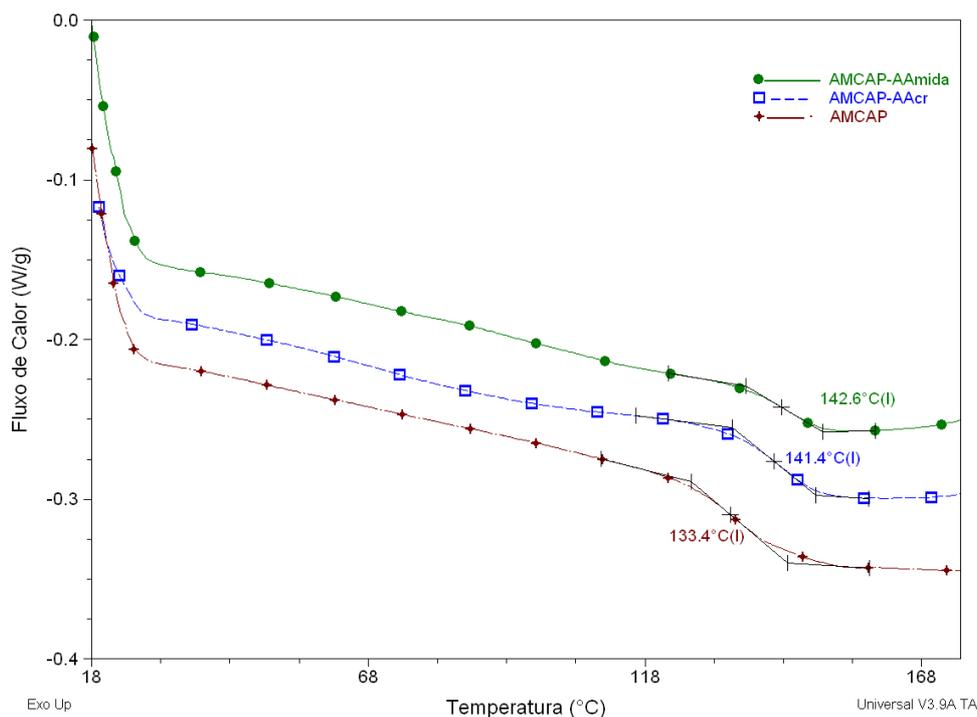


Figura 59 - Curvas de DSC do AMCAP de partida e dos AMCAP modificado com os monômeros AAc e AAm.

O AMCAP-AAc e o AMCAP-AAm apresentam uma T_g 8°C e 9.2°C respectivamente acima do AMCAP (133,4 °C). Os agrupamentos laterais (Figuras 41 e 44), existentes nas duas estruturas modificadas originam interações secundárias intermoleculares, que incrementam a energia potencial associada aos movimentos conformacionais que acontecem acima da temperatura de transição vítrea, conseqüentemente a T_g dos polímeros será maior nos polímeros modificados.

4.5.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA DOS SUPORTES POLÍMEROS

O comportamento térmico dos suportes derivados da celulose (AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm) assim como da quitosana (CS) foram analisados utilizando diferentes atmosferas nitrogênio (figura 60) e ar (figura 61).

O perfil de degradação térmica dos derivados celulósicos (figura 60), em atmosfera de nitrogênio apresenta à principal perda de massa a 379°C.

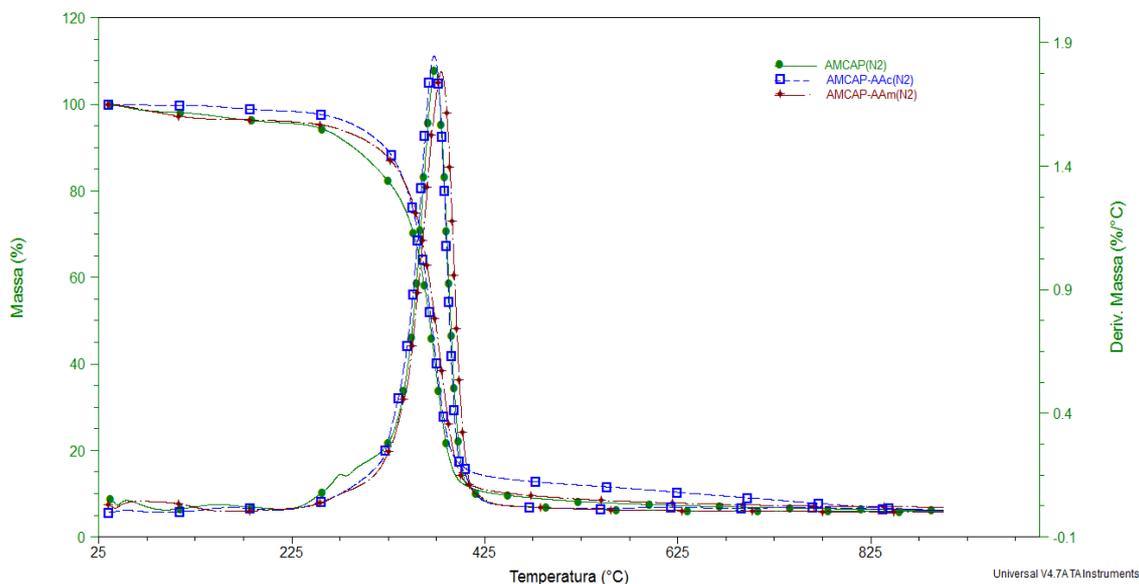


Figura 60 – Curva termogravimétrica do AMCAP de partida e dos modificados em atmosfera de nitrogênio.

Os polímeros modificados apresentam um discreto aumento da temperatura de máxima taxa de degradação (Tabela 4). Tal comportamento pode ser atribuído ao efeito que originam a presença dos grupos laterais enxertados. Estes induzem uma maior interação secundária entre as cadeias, si comparados com o AMCAP e conseqüentemente uma maior estabilidade térmica.

O perfil de degradação em atmosfera de ar (figura 61) mostrou uma redução na estabilidade térmica dos polímeros (tabela 4). A temperatura acima de 400°C o AMCAP-AAc, caracteriza-se por uma maior perda de massa com a geração de moléculas voláteis devido à cisão aleatória da cadeia da principal da celulose. (Jeong *et. al.*, 2012)

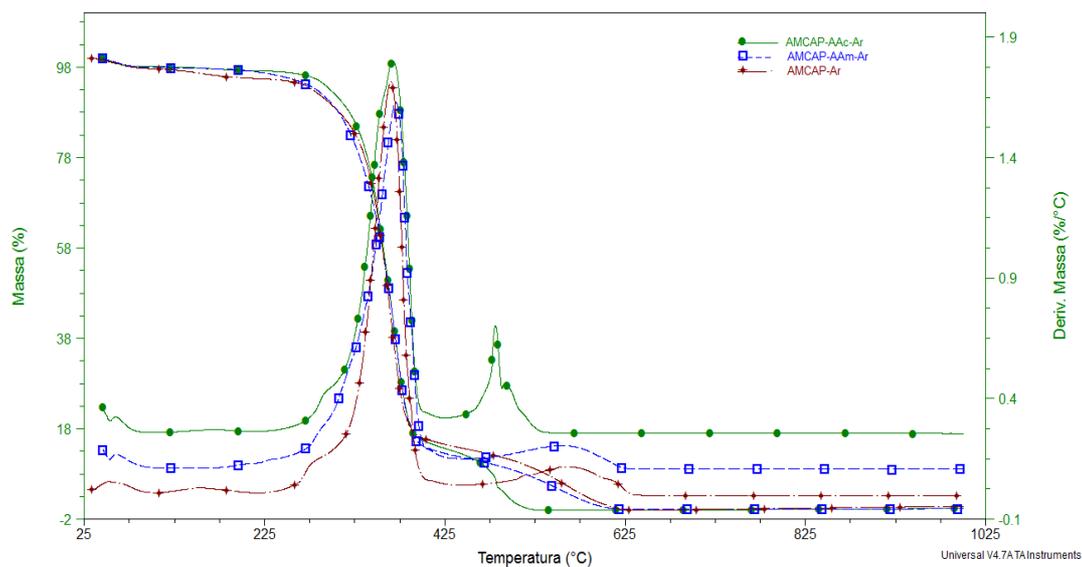


Figura 61 – Curva termogravimétrica do AMCAP de partida e dos modificados em atmosfera de ar.

O perfil de degradação térmica da quitosana (Figura 62) em relação aos derivados celulósicos estudados evidencia um maior efeito da atmosfera oxidante em seu comportamento térmico.

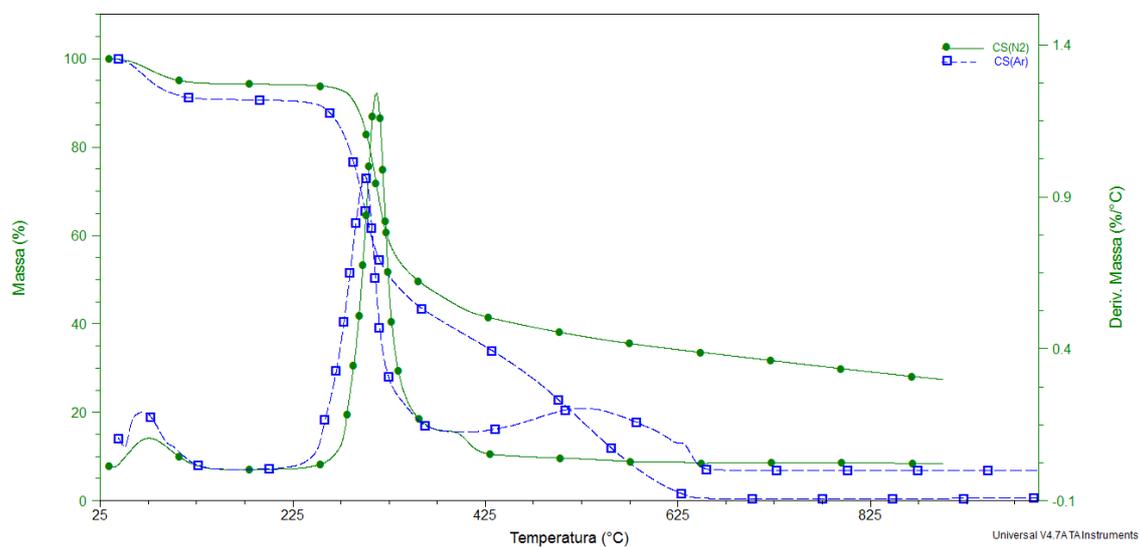


Figura 62 – Curva termogravimétrica da Quitosana em atmosfera de ar e nitrogênio.

O comportamento térmico da quitosana em atmosfera de N_2 se caracteriza pela presença de dois picos bem definidos e um ombro acima de $300^\circ C$.

O primeiro pico, abaixo de $100^\circ C$, está associado à perda de água, tanto entre as ligações fracas com os grupos amina da quitosana, quanto entre as ligações mais fortes com os grupos hidroxilas. A segunda e principal perda de massa ($311^\circ C$) é atribuída à decomposição da quitosana seguida de vaporização e eliminação dos voláteis. A terceira perda de massa que aparece como um ombro a temperaturas superiores a $400^\circ C$ corresponde às reações de decomposição residual. (Campana-Filho, *et al.*, 2007)

O perfil de degradação, observado em atmosfera de ar, denota de forma mais pronunciada para os derivados celulósicos uma menor estabilidade térmica (Tabela 4) da quitosana. A atmosfera oxidante induz um processo de decomposição oxidativa da quitosana (Kaczmarek, *et al.*, 2010) a temperaturas mais baixas. A temperaturas acima de $400^\circ C$ se observa uma marcada diferença no perfil devido a presença de resíduos do processo de degradação na atmosfera inerte. Estes resíduos são oxidados formando CO_2 e H_2O quando utilizada como atmosfera ar.

Tabela 4 - Temperatura máxima de degradação térmica dos polímeros, quitosana, AMCAP e dos modificados.

Polímeros	Tmax		Tonset	
	N_2	Ar	N_2	Ar
AMCAP	373,2	365,1	343,84	335,13
AMCAP-AAc	372,4	367,6	343,29	336,62
AMCAP-AAm	379,9	370,7	348,3	331,28
Quitosana	311,5	295,7	294	275,07

O comportamento térmico dos derivados da celulose como da quitosana permitem sua utilização a temperaturas até 200°C tanto em atmosfera inerte (N_2) como oxidante (ar).

4.5.3 – ÂNGULO DE CONTATO

As medidas de ângulo de contato assim como as medidas calorimétricas constataam as modificações realizadas por enxerto dos monômeros AAC e AAM na estrutura do derivado celulósico AMCAP.

As modificações foram direcionadas para criar um centro ativo capaz de imobilizar a lipase numa matriz polimérica que apresenta em cada caso uma hidrofiliidade diferente para observar o impacto desta na atividade da enzima imobilizada.

A tabela 5 relaciona os valores do ângulo de contato (θ), com a água, substrato polar capaz de estabelecer uma ponte de hidrogênio com os grupos hidroxila presente na cadeia principal da estrutura celulósica (Figura 47) e com as ramificações que diferenciam cada polímero, AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm assim como a CS.

Os resultados indicam uma hidrofiliidade decrescente nos polímeros na ordem AMCAP-AAc>AMCAP-AAm>CS>AMCAP, ou seja, uma menor capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio ou um menor número destes com a água (Kunita, 2005), desta forma a molhabilidade da superfície dos polímeros modificados é significativamente maior nos polímeros modificados a consequência da introdução dos grupos carboxílicos e aminos na estrutura do AMCAP.

Tabela 5 – Medidas de ângulo de contato dos polímeros de origem celulósico e da quitosana.

Líquido	Sólido	(°)	Sólido	(°)	Sólido	(°)	Sólido	(°)
Água	AMCAP	81,2	AMCAP-AAc	44,9	AMCAP-AAm	58,3	Quitosana	78,7
Água	AMCAP	81,4	AMCAP-AAc	44,6	AMCAP-AAm	57,4	Quitosana	76,7
Água	AMCAP	81,3	AMCAP-AAc	44,9	AMCAP-AAm	57,3	Quitosana	72,3
Água	AMCAP	81	AMCAP-AAc	44,1	AMCAP-AAm	55,3	Quitosana	71,3
Água	AMCAP	80,8	AMCAP-AAc	44,7	AMCAP-AAm	54,1	Quitosana	67,9
Água	AMCAP	80,8	AMCAP-AAc	45,3	AMCAP-AAm	48,7	Quitosana	66,6
Água	AMCAP	80,8	AMCAP-AAc	44,1	AMCAP-AAm	47	Quitosana	65,5
Água	AMCAP	82,4	AMCAP-AAc	44,7	AMCAP-AAm	46,8	Quitosana	59,6
Água	AMCAP	81,9	AMCAP-AAc	44,3	AMCAP-AAm	46	Quitosana	54,5
Água	AMCAP	81,6	AMCAP-AAc	53	AMCAP-AAm	45,7	Quitosana	52,5
	Média	81,3		45,5		51,6		66,5

4.6 – CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

4.6.1 - MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROPARTÍCULAS DE SUPORTE

A morfologia das micropartículas contendo o núcleo magnético (figuras 63 e 64) foi investigada com o auxílio das técnicas de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

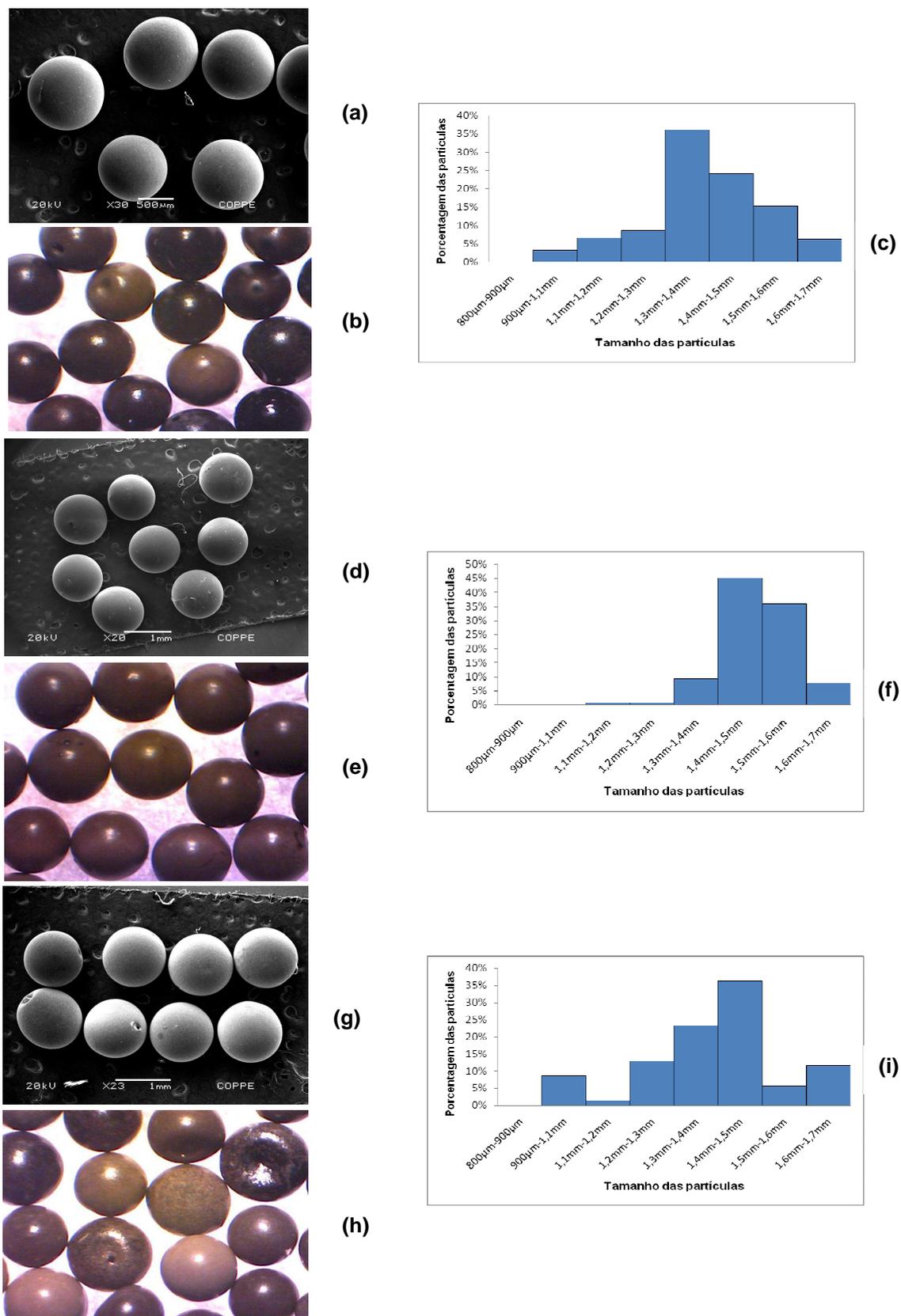


Figura 63 – Micrografia eletrônica de varredura do AMCAP/ Fe_3O_4 , AMCAP-AAC/ Fe_3O_4 e AMCA-AAM/ Fe_3O_4 (a, d e g), micrografia ótica (b, e e h) e gráfico da distribuição das micropartículas (c, f e i).

As micropartículas têm um formato regular esférico (figura 63, a, b, d, e, g e h) e uma distribuição de tamanho relativamente estreita (figura 63, c, f e i).

Os suportes de origem celulósico preparados pela técnica de emulsão apresentaram uma mesma faixa de distribuição com 91,3 a 100% das micropartículas com diâmetro entre 1 e 1,7mm (Tabela 6).

Para a quitosana (figura 64, Tabela 6) o máximo de distribuição esta localizada numa faixa menor, entre 600-900 μ m a pesar do interesse de que fosse à mesma faixa dos suportes celulósicos como consequência das restrições experimentais para obter um formato esférico regular (sem calda).

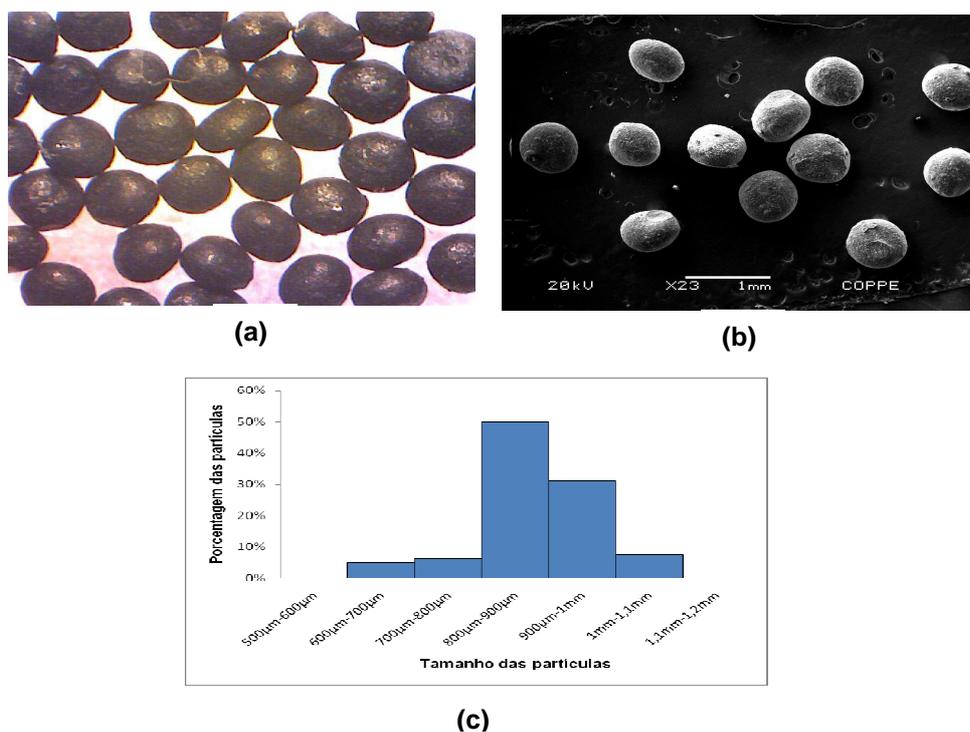


Figura 64 - Micrografia ótica (a), micrografia eletrônica de varredura (b) e gráfico da distribuição das micropartículas de Quitosana/Fe₃O₄ (c).

Tabela 6 – Distribuição de tamanhos de micropartículas dos diferentes suportes.

Suportes pelo método de simples emulsão	Distribuição de tamanhos (%)	
	900µm-1,1mm	1,1mm-1,7mm
AMCAP	3	97
AMCAP-AAc	0	100
AMCAP-AAm	8,7	91,3
Suportes pelo método de coagulação	600µm-900µm	1mm-1,2mm
QUITOSANA	92,5	7,5

A metodologia seguida para a preparação permite obter partículas de tamanhos em torno de 1mm e distribuição estreita tanto para o derivado de celulósico como para a quitosana, os quais são apropriados para uma distribuição uniforme no leito fluidizado do reator evitando a formação de caminhos preferenciais, quando utilizados como suporte catalítico. (Teixeira, 2011)

A morfologia superficial das micropartículas (figura 65) tanto para os derivados celulósicos preparados por emulsão como para a quitosana preparada 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 do catalisador com o substrato. (Canilha *et. al.*, 2006)

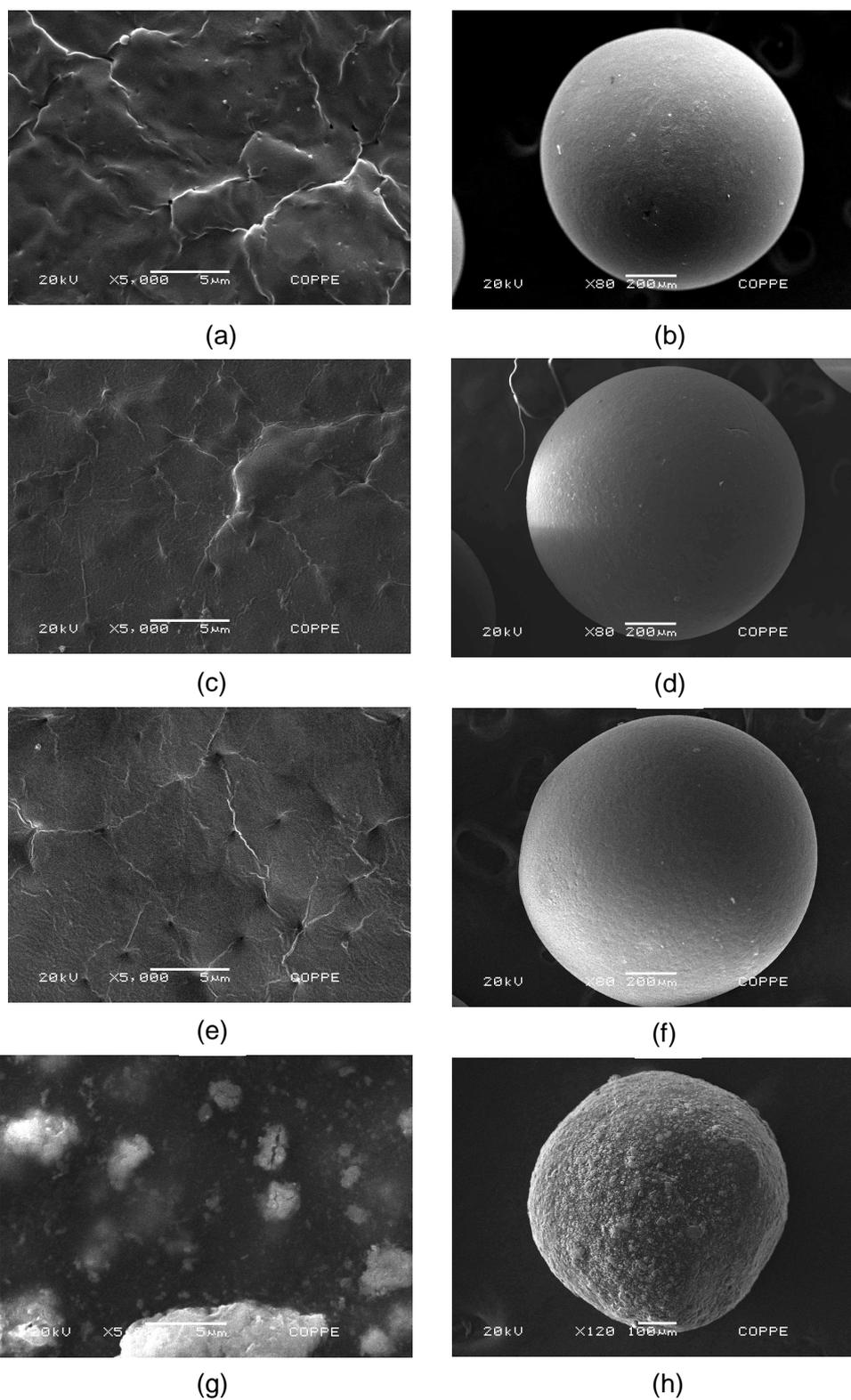


Figura 65 - Micrografia eletrônica de varredura da superfície das micropartículas de AMCAP/ Fe₃O₄ (a); AMCAP-AAc/Fe₃O₄ (c); AMCAP-AAm/ Fe₃O₄ (e) e CS/ Fe₃O₄ (g) aumento de 5000x e das micropartículas de AMCAP/ Fe₃O₄ (b); AMCAP-AAc/Fe₃O₄ (d); AMCAP-AAm/ Fe₃O₄ (f) e CS/ Fe₃O₄ (h) aumento de 80x.

4.7.2 – DETERMINAÇÃO DA CARGA MAGNÉTICA (Fe_3O_4) NOS SUPORTES POLIMÉRICOS

Uma vez que a resposta magnética dos suportes celulósicos (AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm) e da quitosana são calculados por gramas de carga (emu/g) foi necessário utilizar uma técnica termogravimétrica para calcular a massa encapsulada.

As condições de análises foram estabelecidas considerando o comportamento tanto da matriz polimérica como do núcleo magnético (Fe_3O_4) estabilizado com ácido oléico.

Ensaio preliminares foram realizados em atmosfera inerte (nitrogênio) e oxidante (ar) utilizando a magnetita estabilizada (figura 66).

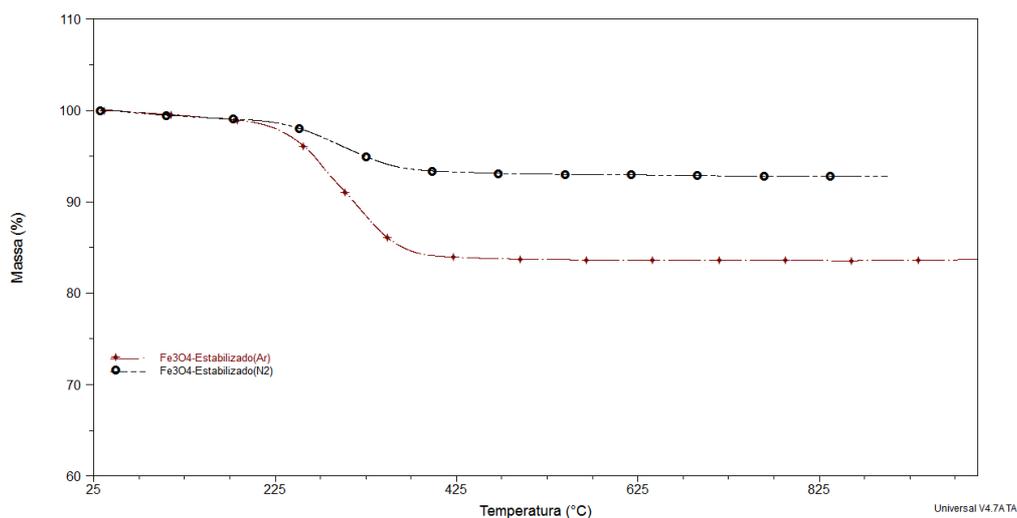


Figura 66 - Curvas termogravimétricas da Fe_3O_4 em atmosfera de ar e nitrogênio.

O comportamento observado indica que existe uma perda completa do ácido oléico utilizado na estabilização nas condições oxidantes e que a magnetita é estável nestas condições até temperatura de 900°C .

A determinação da carga magnética dos suportes AMCAP, AMCAP-AAc, AMCAP-AAm e AMCAP-modif-AAm (figuras 67, 68, 69 e 70) foi realizada a 850°C nas mesmas condições anteriormente indicada (atmosfera oxidante).

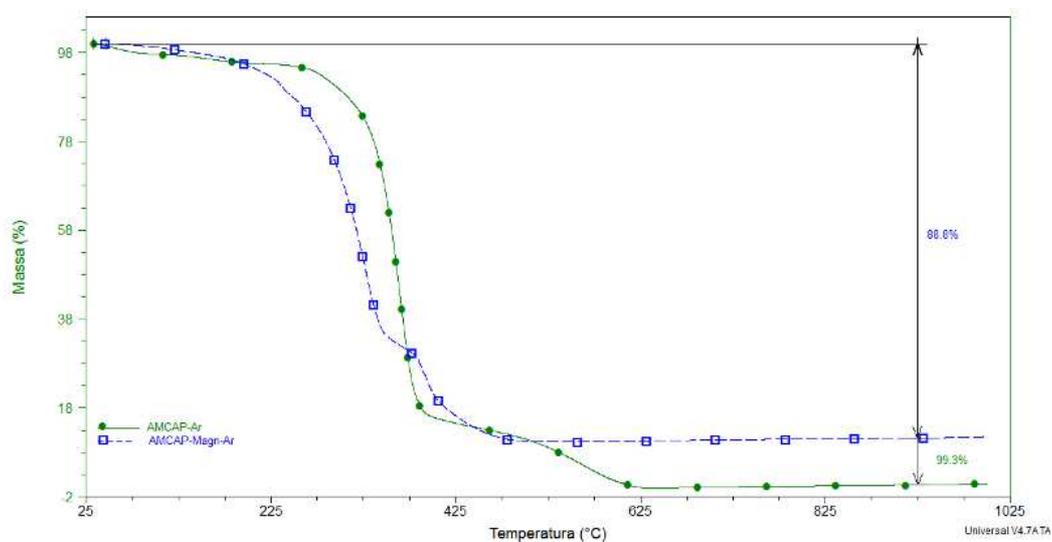


Figura 67 – Curvas termogravimétricas do polímero AMCAP e das microcápsulas magnéticas AMCAP.

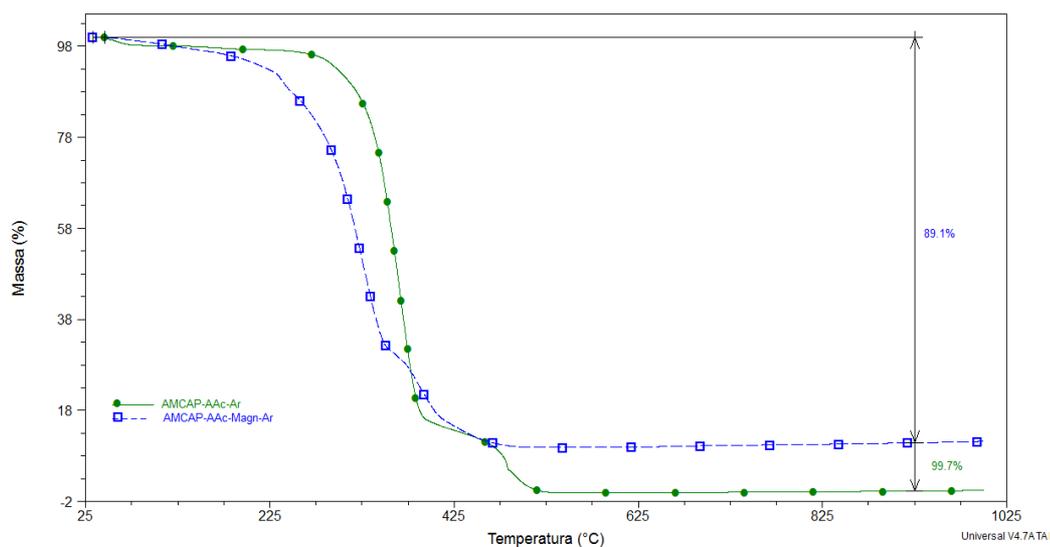


Figura 68 – Curvas termogravimétricas do polímero AMCAP-AAc e das microcápsulas magnéticas de AMCAP-AAc.

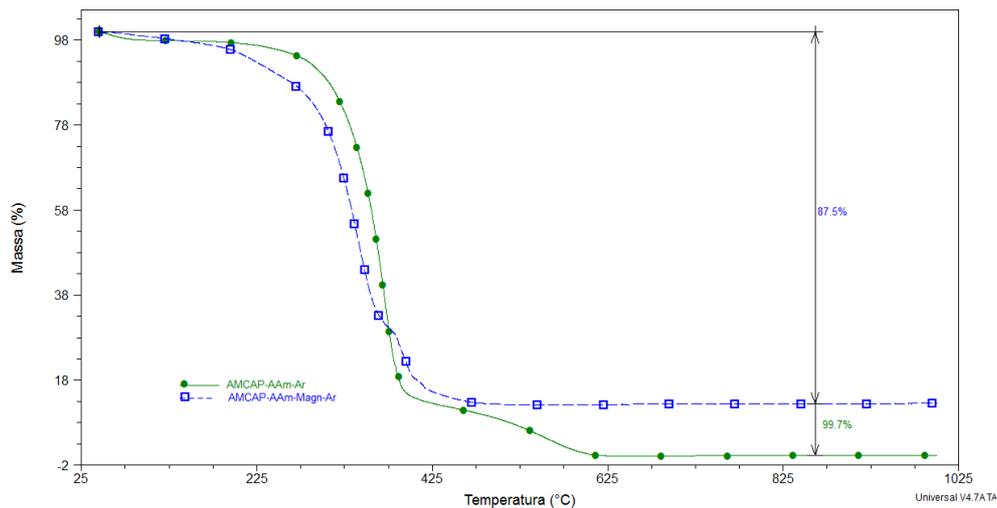


Figura 69 – Curvas termogravimétricas do polímero AMCAP-AAm e das microcápsulas magnéticas AMCAP-AAm.

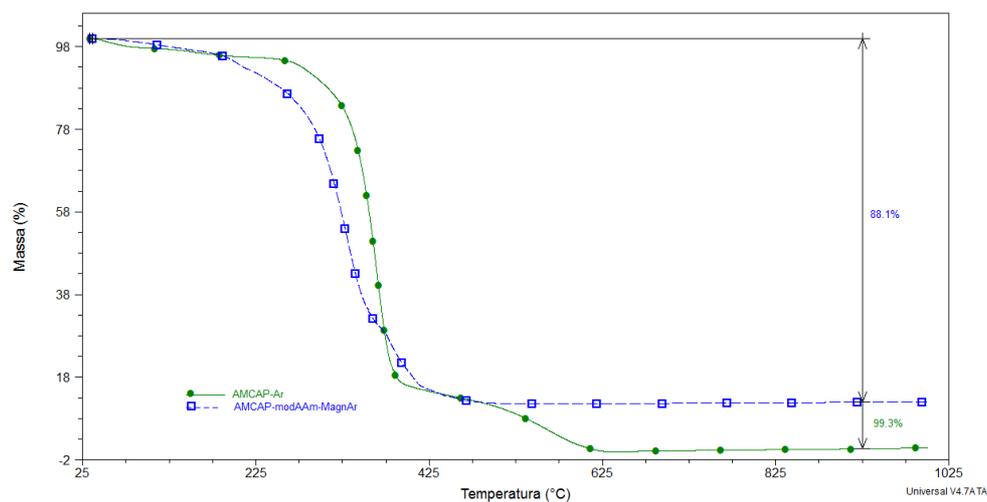


Figura 70 – Curvas termogravimétricas do AMCAP e das microcápsulas magnéticas de AMCAP-modif-AAM.

Os resíduos relativos a carga de magnetita foram 11,5% no AMCAP, 10,6% para o AMCAP-AAc, 12% em AMCAP-AAm e 11,2% no AMCAP-modif-AAm, cargas muito próximas para todos estes suportes preparados com metodologias semelhantes.

O suporte de quitosana (figura 71) apresentou uma carga maior (27%) que não foi possível reduzir sem comprometer tamanho de partículas e morfologia esférica.

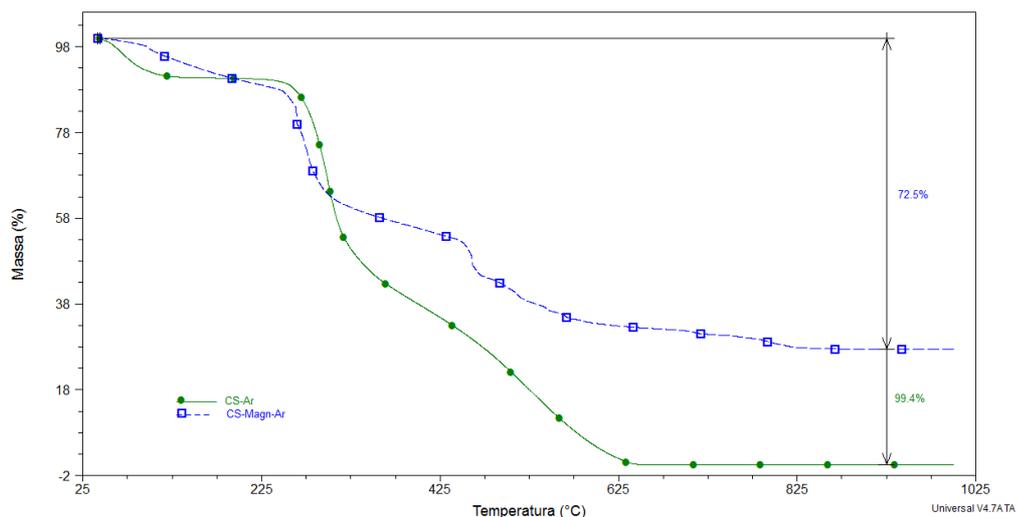


Figura 71 – Curva termogravimétrica da quitosana e das microcápsulas magnéticas de quitosana.

4.7.3 – CARACTERIZAÇÃO DOS NÚCLEOS MAGNÉTICOS POR ESPECTROSCOPIA MOSSBAUER

As micropartículas magnéticas tanto dos derivados celulósicos como da quitosana foram formulados utilizando o material magnético previamente preparado utilizando sais de ferro como apresentado no capítulo anterior. O núcleo magnético foi caracterizado em termos de composição com auxílio da espectroscopia mössbauer.

O espectro (figura 72) obtido para as micropartículas CS/Fe₃O₄, apresentaram um duplete (linha azul) e dois sextetos (linha rosa e verde escuro) associados a magnetita, característico da fase magnética e a distribuição dos campos hiperfinos (linha verde claro). (Gomes *et. al.*, 1999)

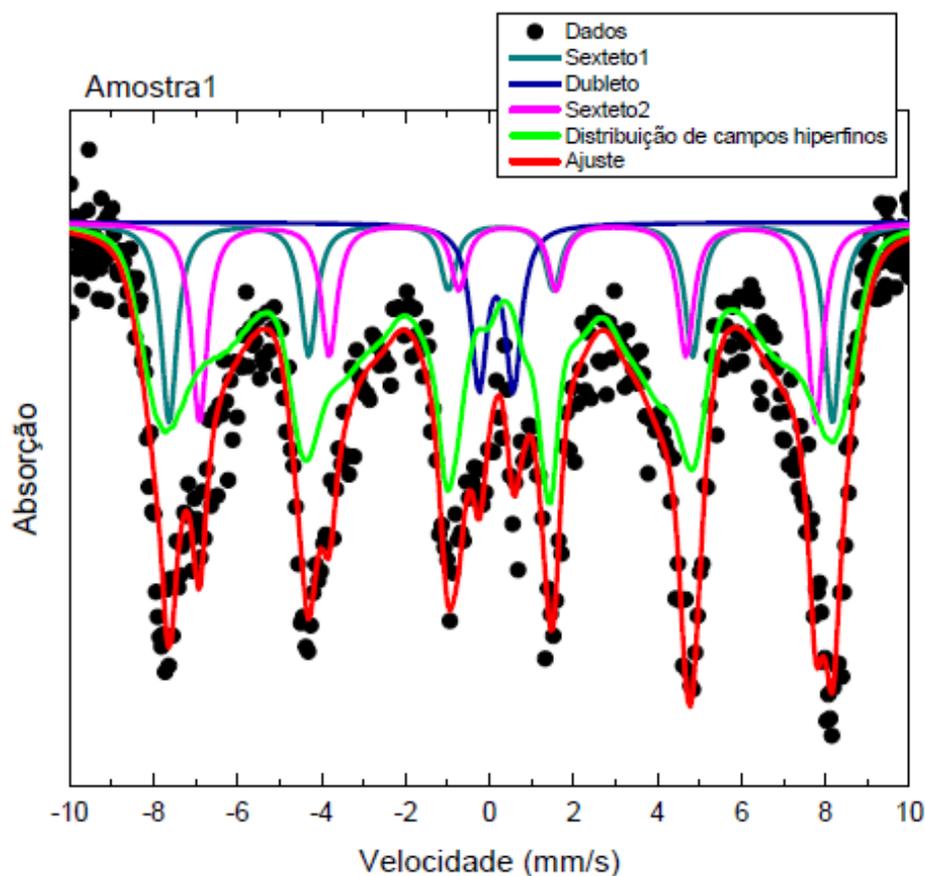


Figura 72 - Espectro mössbauer das micropartículas de CS/Fe₃O₄.

Na magnetita pura, Fe₃O₄, o ferro está situado em dois sítios cristalograficamente não equivalentes, tetraédrico e octaédrico. O espectro da magnetita [Fe³⁺]^{tetra} [Fe³⁺, Fe²⁺]^{octa}O₄, à temperatura ambiente é composta por estes dois sextetos, caracterizados por campos hiperfinos. (Gomes *et. al.*, 1999). A presença de sexteto adicional é própria de um comportamento superparamagnético ou próximo a este comportamento. (Arica *et. al.*, 2008)

A linha verde associada à distribuição dos campos hiperfinos, mostra que as nanopartículas que formam o núcleo magnético, têm uma distribuição de tamanho larga. Esta informação para o caso da quitosana é plausível considerando que estas micropartículas apresentam uma carga maior (27%) mais que o dobro em comparação as micropartículas formuladas com o AMCAP e derivados que estão em torno de 12% em massa o que pode estar acompanhado de uma distribuição de tamanho mais larga. Resultados que foram semelhantes para os derivados de celulósicos.

4.7.4 - PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DOS SUPORTES POLIMÉRICOS

As medidas de magnetização da magnetita sintetizada figura 73 (a) e das micropartículas contendo o núcleo magnético (figura 74-77) foram realizadas para caracterizar o comportamento magnético. A curva de magnetização não apresentou histereses nem magnetização permanente ou indução residual caracterizando um comportamento super paramagnético para as partículas magnéticas sintetizadas (Bouças, 2008). A magnetização de saturação foi de 38emu g^{-1} valor que esta dentro do intervalo esperado entre 30-50 emu/g segundo Schuth e colaboradores (2007). E a influência do ímã sobre a magnetita foi rápida, figura 73 (b).

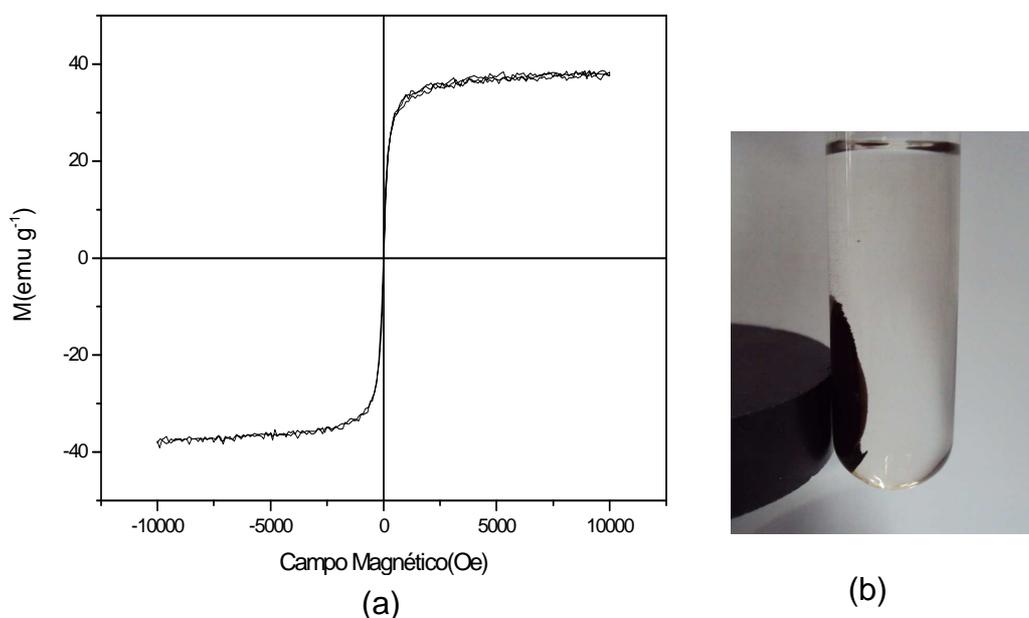


Figura 73 - Curva de magnetização para a magnetita (a) e magnetita atraída pelo ímã (b).

As curvas de magnetização das micropartículas de $\text{AMCAP/Fe}_3\text{O}_4$, $\text{AMCAP-AAc/Fe}_3\text{O}_4$, $\text{AMCAP-AAm/Fe}_3\text{O}_4$ e da $\text{CS/Fe}_3\text{O}_4$ (figuras 74-77) apresenta um ponto similar no que não se observa histerese evidenciando uma baixa coercividade e uma reversibilidade elevada, ou seja, a influência dos campos magnéticos sobre as microcápsulas teve uma resposta rápida e, quando o campo magnético foi anulado, não houve magnetização permanente

ou indução residual (o material só deve possuir magnetismo enquanto o campo lhe é aplicado, no momento em que o campo é retirado o magnetismo deve cessar). Se a magnetização não cessar, após a retirada do campo, as micropartículas podem permanecer aglomeradas, dificultando o seu processo de regeneração. (Costa et. al., 2012)

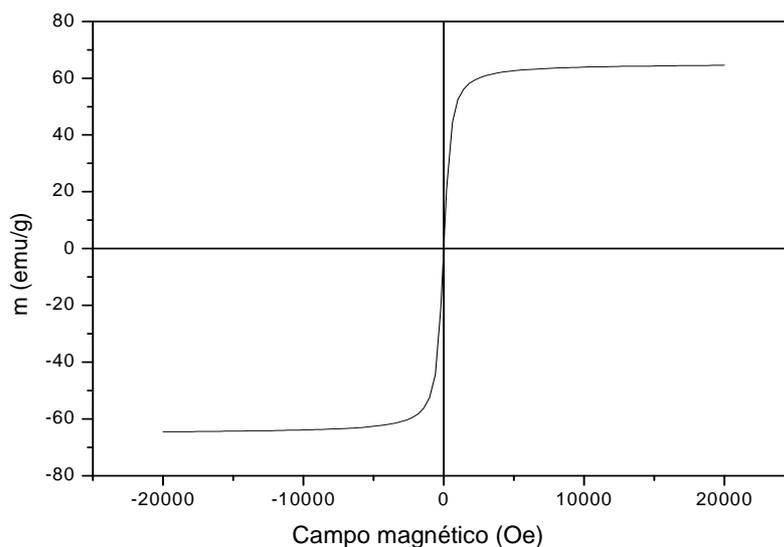


Figura 74 - Curva de magnetização das micropartículas de AMCAP/Fe₃O₄.

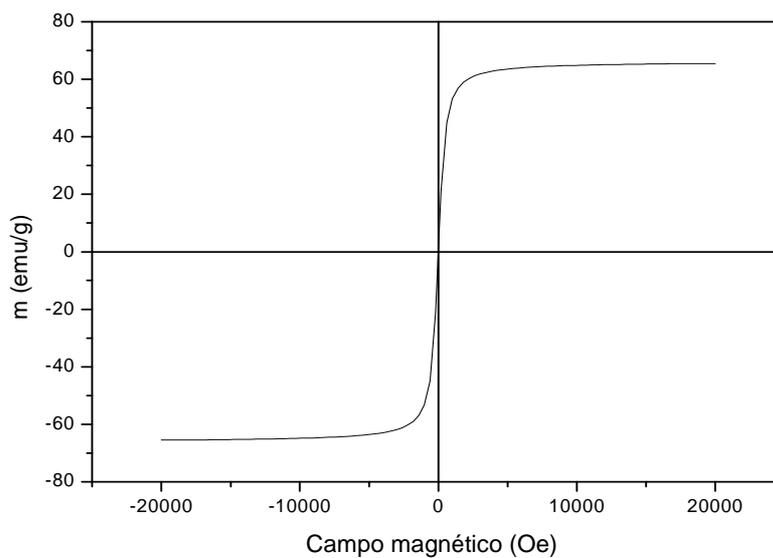


Figura 75 - Curva de magnetização das micropartículas de AMCAP-AAc/Fe₃O₄.

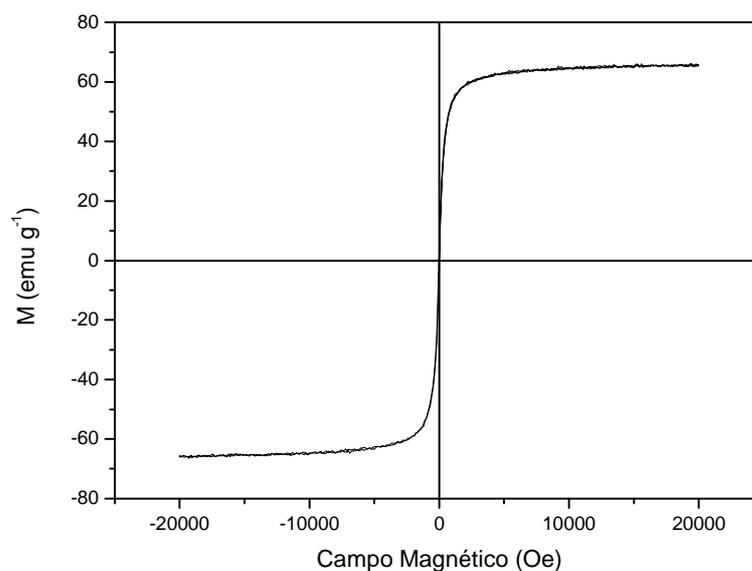


Figura 76 - Curva de magnetização das micropartículas de AMCAP-AAm/Fe₃O₄.

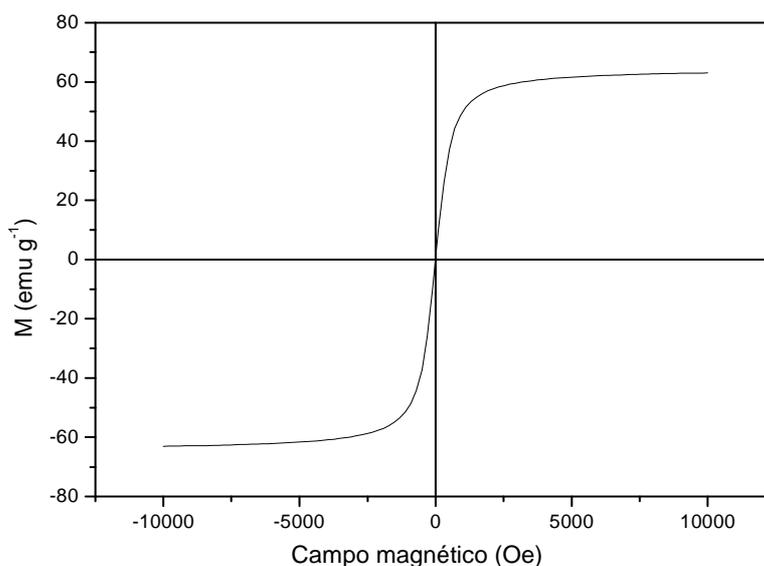


Figura 77 - Curva de magnetização das micropartículas de CS/Fe₃O₄.

Estes comportamentos super paramagnéticos observados nos suportes objeto de estudo e a relativa elevada magnetização de saturação (Tabela 7) 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 (Xie et. al., 2012). Na literatura reporta valores de saturação bem inferiores de 8 à 30emu/g, que para operar em reatores de leito fluidizado precisa de um campo magnético maior gerando um maior custo (Li et. al., 2009; Souza et. al., 2006; Costa et. al., 2012) e valores próximos de 50 à 70emu/g. (Castanharo et. al., 2012 e Lee et. al., 2009)

Tabela 7 - Magnetização de saturação dos diferentes suportes.

Suporte	Magnetização de saturação
AMCAP/Fe ₃ O ₄	65emu/g
AMCAP-AAc/Fe ₃ O ₄	65emu/g
AMCAP-AAm/Fe ₃ O ₄	65,9emu/g
CS/Fe ₃ O ₄	66emu/g

4.8 - ATIVAÇÃO DOS SUPORTES MAGNÉTICOS COM GLUTRALDEÍDO

As condições de ativação dos suportes magnéticos com glutaraldeído foram estabelecidas a partir da ativação da quitosana. Partindo das condições experimentais existentes na literatura (Gonçalves et. al., 2005; Huang et. al., 2005 e Mansur, et. al., 2008) foram selecionadas concentrações entre 2-8% em massa de glutaraldeído e tempos de exposição entre 3-6 horas.

Através da espectroscopia infravermelho (Figuras 78-79) foi acompanhada a modificação da quitosana com o glutaraldeído através do nitrogênio nucleofílico do grupo amina ($-\text{NH}_2$) que reage com o carbono do aldeído, o qual desloca o oxigênio do aldeído e resulta na perda da molécula de água formando assim a ligação $\text{C}=\text{N}$ ($1650 - 1750\text{cm}^{-1}$), base de Schiff. E em ($1600 - 1650\text{cm}^{-1}$) associada á ligação amina, $-\text{NH}_2$, (Mansur et. al., 2008).

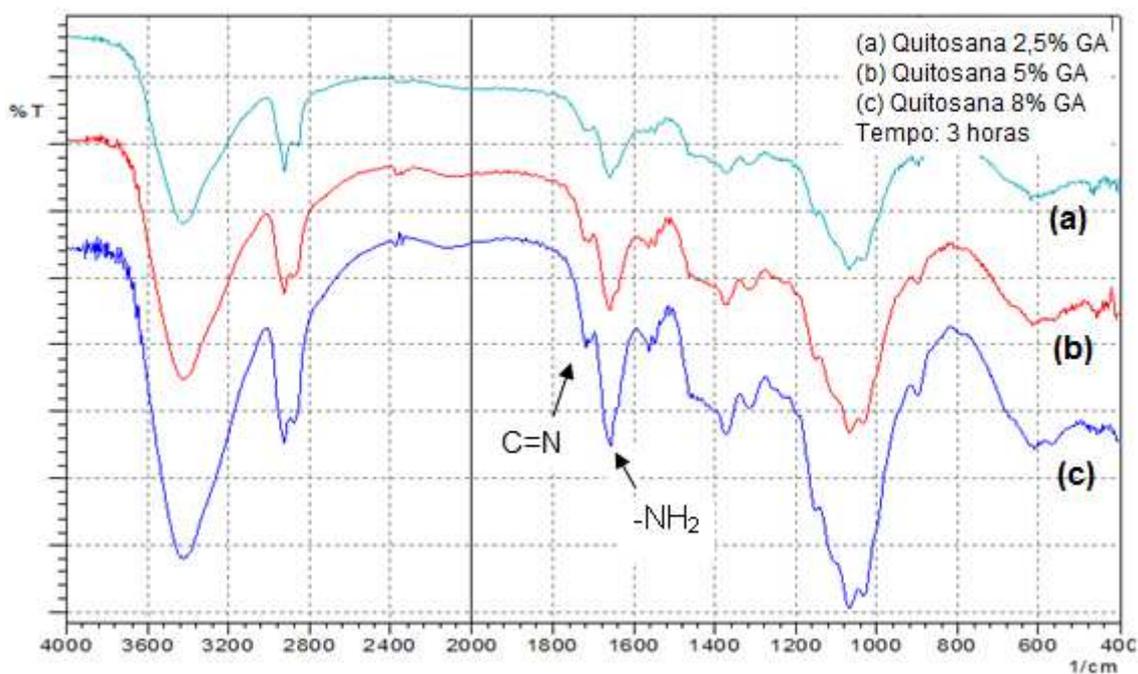


Figura 78 - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 3 horas.

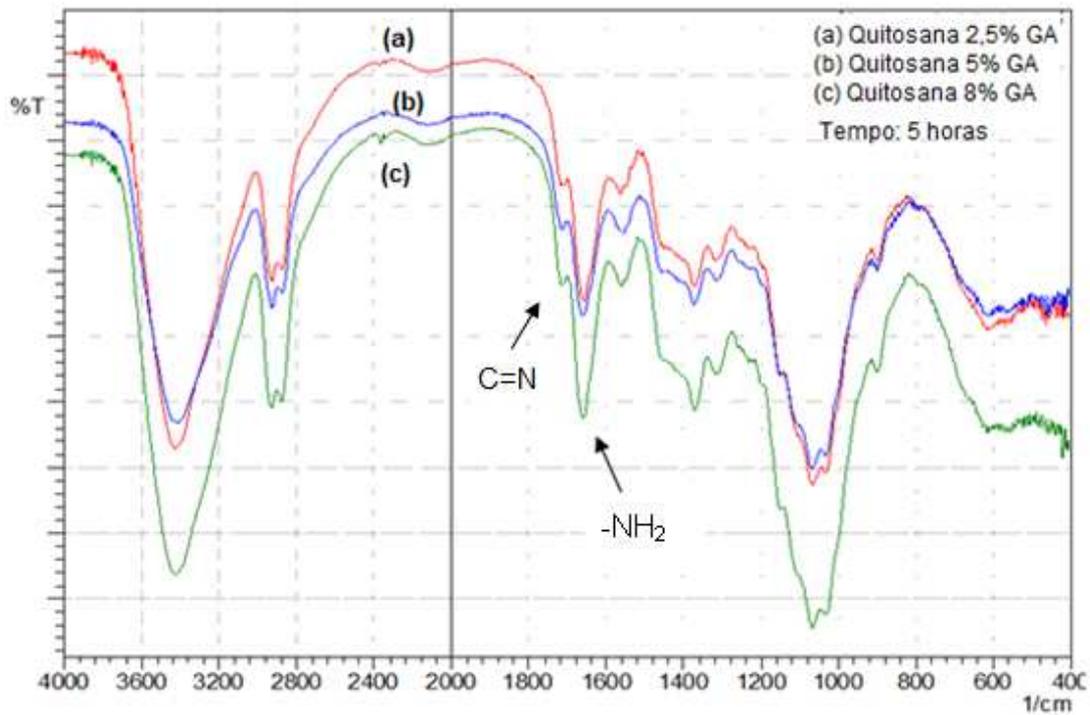


Figura 79 - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 5 horas.

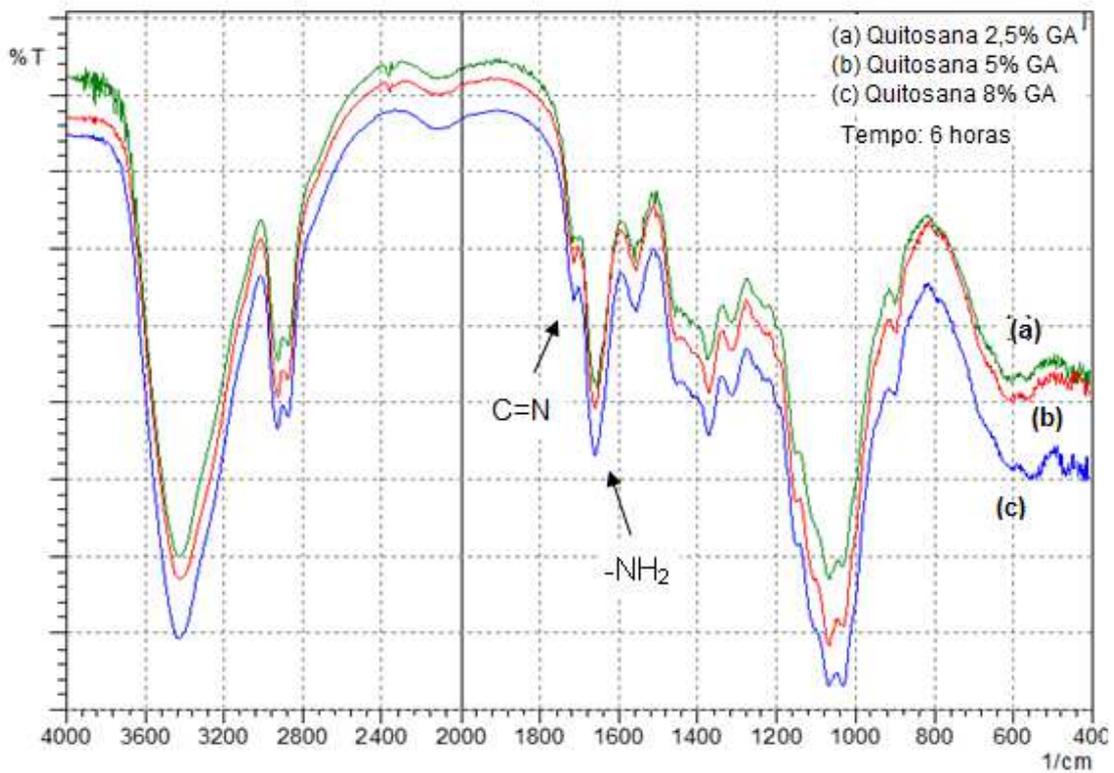


Figura 80 - Espectros de infravermelho das partículas de quitosana, com concentração de GA (a) 2,5%; (b) 5%; (c) 8% com o tempo de 6 horas.

Nas figura 78-80 foi acompanhada a relação de intensidade entre o sinal da ligação C=N e o agrupamento NH₂ com o agrupamento -CH₃ que não sofre modificação. A relação de intensidade $I_{C=N}/I_{CH_3}$ para a quitosana ativada com glutaraldeído no período de 3horas na concentração de 2,5%, 5% e 8% foi de 1.03, 1.05 e 1.1, e no período de 6horas, na mesma concentração foi de 1.11, 1.12 e 1.12.

O maior aumento na intensidade observado no tempo de 3horas foi de 8% em massa, sendo que no tempo de 6horas a partir da concentração de 5% a intensidade manteve sem alteração. O tempo de 6horas e a concentração de 8% em massa determinarão as condições de ativação para todos os suportes com agrupamentos aminos.

4.9 – ATIVIDADE CATALÍTICA

A Lipase AK foi imobilizada covalentemente aos suportes ativados com o glutraldeido com vista a aumentar sua estabilidade térmica durante sua utilização em comparação com a forma livre (Nascimento et. al., 2004).

A imobilização foi realizada tomando como referencia as condições de pH e temperatura para as quais foram reportadas na literatura a maior atividade da enzima lípase. (Castro et. al., 1999; Pereira et. al, 2010) As condições de imobilização foi com pH 7,0 e temperatura de 40°C.

4.9.1 – CONCENTRAÇÃO DA ENZIMA, MÉTODO DE BRADFORD E ATIVIDADE HIDROLÍTICA.

A análise da atividade enzimática após imobilização da Lipase AK em superfícies que apresentam diferentes ambientes químicos foi realizada acompanhando a metodologia citada na literatura (Mendes, 2009 e Cetinus et. al., 2007).

A metodologia utilizada determina a concentração da Lipase após preparar uma solução tampão (5mg/mL) pelo método Bradford (Shah, et. al., 2009) e utilizando este mesmo método depois de realizado o processo de imobilização.

A concentração da lipase AK determinada (0,580mg/mL), (Tabela 8) apesar da limitada solubilidade desta Lipase no tampão utilizado resultou muito abaixo do esperado. Neste caso concluímos que o método de Bradford apesar de ser rápido sensível e utilizado por outros autores, apresenta limitações para a determinação da concentração desta lipase AK provavelmente a coloração amarelada da solução e possível interferência do tampão (Zaia *et. al.*, 1998).

Tabela 8 - Parâmetros para a determinação da enzima lipase AK

Alíquota	Leitura 1	Leitura 2	Leitura 3	Média 1	Média _{real}	Massa	Concentração
1	0,796	0,796	0,791	0,794	0,095	1,082	0,541
2	0,861	0,875	0,861	0,866	0,167	3,391	0,678
3	0,913	0,934	0,919	0,922	0,223	5,214	0,521

Média 1 = média das leituras da coluna 2,3 e 4

Média_{real} = média da coluna 5 menos o branco da curva de calibração.

Massa = massa obtida colocando os valores da média_{real} na equação do gráfico da curva padrão. (mg/alíquota).

Concentração= a massa obtida na coluna 7 dividida por alíquota, para se obter a concentração da amostra (mg/mL)

Branco = 0,6999

A consequência das dificuldades encontradas na determinação da concentração da Lipase pelo método anteriormente citado utilizou outra estratégia para avaliar a atividade da lipase imobilizada com o propósito apenas de comparar o efeito do suporte utilizado na atividade da Lipase. A estratégia se baseia na determinação da velocidade da reação hidrolítica da enzima no sistema imobilizado utilizando o método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Castro *et al.*, 1999. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima

que libera em 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação, nas condições do ensaio.

Os resultados encontrados (Tabela 9) indicam diferenças na atividade hidrolítica para os diferentes biocatalisadores.

Tabela 9 - Valores da atividade hidrolítica dos suportes imobilizados.

Suporte/Lipase AK	Atividade Hidrolítica U/g
AMCAP-AAc (Fe_3O_4)	2013
AMCAP-AAm (Fe_3O_4)	3086
AMCAP+ (AAm) (Fe_3O_4)	3120
CS (Fe_3O_4)	2269

Apenas de forma preliminar, estas diferenças na atividade podem indicar que o aumento da hidrofiliicidade da superfície do suporte em relação a quitosana não foi favorável a um aumento da atividade. O suporte com superfície mais hidrofílico AMCAP-AAc apresenta menor atividade, entretanto, se compararmos a atividade do AMCAP-AAm e da QUITOSANA com maior hidrofobicidade maior o efeito contrário. Sendo assim uma explicação seria as diferenças no deslocamento da enzima da superfície que indica AMCAP-AAm e AMCAP+(AAm) > AMCAP-AAc e CS ser favorável o que pode ser explicado a partir de uma maior liberdade conformacional da enzima e conseqüentemente uma maior atividade hidrolítica.

Trabalhos de Huang (2005) e Pereira (2010), relatam estudos de imobilização de enzimas em suporte de quitosana com núcleo magnético, com atividade de 322 e 320U/g, uma atividade inferior as micropartículas de CS- Fe_3O_4 de 2269U/g. Esta atividade baixa pode ser devido as condições de pH, temperatura, caráter hidrofílico e espaçadores que não favoreceram a uma conformação da enzima para uma maior atividade.

Estudos mas conclusivos devem ser realizados quantificando os moles de enzima imobilizados.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

- O polímero AMCAP foi submetido (acrilamidometil acetato propionato de celulose) a um processo de enxertia via radicalar utilizando o ácido acrílico e a acrilamida em condições de ativação que permitissem a adição de uma unidade monomérica para introdução das respectivas funções químicas na estrutura celulósica. Os espectros de RMN de ^{13}C dos polímeros modificados mostram que a intensidade do sinal da dupla ligação referente ao C_{20} e C_{21} (132 e 126ppm) no AMCAP-AAc e para o AMCAP-AAm diminuem em relação ao polímero de partida (AMCAP).
- Através dos resultados dos processos de fragmentação, induzidos termicamente, dos polímeros AMCAP-AAc, AMCAP-AAm e no AMCAP é possível confirmar a existência de diferenças que podem vir a justificar as modificações pretendidas utilizando os monômeros ácido acrílico e acrilamida para originar o enxerto na cadeia lateral do AMCAP.
- O AMCAP-AAc tem uma T_g a 8°C acima do AMCAP ($133,4^\circ\text{C}$) e o AMCAP-AAm de $9,2^\circ\text{C}$ que podem ser justificadas pelas restrições conformacionais que introduzem os agrupamentos laterais após enxerto do ácido acrílico e a acrilamida respectivamente.
- O comportamento térmico dos polímeros utilizados na formulação dos suportes magnéticos (AMCAP, AMCAP-AAc e AMCAP-AAm) assim como da quitosana (CS) apresentam um discreto aumento da temperatura de máxima taxa de degradação quando utilizada uma atmosfera inerte diferentemente de quando utilizado ar como atmosfera. O comportamento térmico registrado tanto para os derivados de celulose como da quitosana, permite a sua utilização a temperaturas até 200°C .

- Os resultados indicam que as modificações realizadas modificaram a hidrofiliabilidade dos polímeros utilizados na formulação dos suportes como pretendido na ordem decrescente AMCAP-AAc>AMCAP-AAm>CS>AMCAP, ou seja, uma menor capacidade de estabelecer ligações de hidrogênio ou um menor número destes com a água, desta forma a molhabilidade da superfície dos polímeros modificados é significativamente maior a consequência da introdução dos grupos carboxílicos e aminos na estrutura do AMCAP.

- As micropartículas formuladas de AMCAP/Fe₃O₄, AMCAP-AAc/Fe₃O₄, AMCAP-AAm/Fe₃O₄ e QUITOSANA (CS) tem um formato esférico e uma distribuição de tamanho relativamente uniforme, o que para a utilização em reator de leito fluidizado poderá evitar a formação de caminhos preferenciais.

- O núcleo magnético presente nas micropartículas formuladas como suporte foi caracterizado por estar formado principalmente por magnetita conforme identificado a partir dos dois sextetos característicos do efeito mossbauer.

- O comportamento magnético deste núcleo de magnetita foi avaliado a partir das curvas de susceptibilidade magnética as quais não apresentaram histerese e nem magnetização permanente ou indução residual próprio de um comportamento super paramagnéticos.

- Os suportes apresentaram relativa elevada magnetização de saturação, resultado que permitira controlar no reator assistido por campo magnético a distribuição do biocatalisador, a utilização de fluxos maiores e a fácil recuperação do biocatalisador.

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

CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS

ALVES, A. C., CARDOSO, J. F., ALMEIDA, M. A. P., MELO, C. K., LOUZEIRO, H. C. Reaproveitamento de lípase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. **Biodiesel o Novo Combustível do Brasil**, 2005, p. 85-89.

ALBURQUEQUE, C. E. R. **Transesterificação de óleo de soja utilizando catalisadores ácidos em reator micro-ondas**. Dissertação (Mestrado), Universidade Tiradentes – UNIT. 87p. Aracajú, 2010.

ALLINGER, L., CAVA, M. P., JONGH, D. C., JOHNSON, C. R., LEBEL, N. A., STEVENS, C. L. **Química Orgânica**. Segunda Edição. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos, 1976, 961p.

ARACIL, J., MARTÍNEZ, M., VICENTE, G. Integrated biodiesel production: a comparison of different homogeneous catalysts systems. **Bioresource Technology**, n.92, 2004, p.297-305.

ASHBY, R. D., SOLAIMAN, D. K. Y., STRAHAN, G. D., ZHU, C., TAPPEL, R. C., NOMURA, C. T. Glycerine and levulinic acid: Renewable co-Substrates for the fermentative synthesis of short-chain poly(hydroxyalkanoate) biopolymers. **Bioresource Technology**, n.118, 2012, p.272-280.

ARICA, M. Y., SENEL, A. U., YILMAZ, M., BAYRAMOGLU, G. Preparation of nanofibrous polymer grafted magnetic poly(GMA-MMA)-g-MAA beads for immobilization of trypsin via adsorption. **Biochemical Engineering Journal**, n. 40, 2008, p. 262-274.

BART, J. C. J., RAEMAEEKERS, K. G. Applications of simultaneous Thermogravimetry-mass Spectrometry in Polymer Analysis. **Thermochimica Acta**, v. 295, 1997, p. 1-58.

BALTIERI, R. C. **Síntese de macro esferas porosas de amino polímeros: Aplicação em imobilização de biocompostos**. Dissertação (Mestrado), Universidade estadual de Campinas – UNICAMP. 126p. Campinas, 1996.

BRENA, B. M., BATISTA-VIEIRA, F. Immobilization of Enzymes. **A production of humanos press**, 2006, p. 1-30.

BOUÇAS, T. A. O. **Efeito de alguns parâmetros de síntese na obtenção de copolímeros à base de estireno e divinilbenzeno com propriedades magnéticas**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. 61p. Rio de Janeiro, 2008.

BORDADO, J. C., GOMES, J.F., PUNA, J. F. Desenvolvimento de novos catalisadores para a produção de biodiesel. **Química**, n.110, 2008, p.41-44.

BETESTI, M. D., CUNHA, A. G., FREIRE, D. G., LIMA, E. L., PINTO, J. C. Desenvolvimento de partículas poliméricas casca-núcleo para a imobilização de enzimas. **Anais do 10º Congresso Brasileiro de Polímeros** – Foz do Iguaçu – Paraná, 2009.

BOUFI, S., BOUAZIZ, I., REGO, A. M. Physical immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase onto cellulose substrate: Activity and stability studies, 2008, p. 168-177.

BOMMARIUS, A. S., BANSAL, P., HALL, M., REALFF, M. J., LEE, J. H. Multivariate statistical analysis of X-ray data from cellulose: A new method to determine degree of crystallinity and predict hydrolysis rates. **Bioresource Technology**, N. 101, 2010, p. 4461-4471.

CASTRO, H. F., SANTOS, J. C., MENDES, A. A., SILVA, G. A. M., RÓS, P. C. M. R. Evaluation of the catalytic properties of Burkholderia cepacia lipase immobilized on non-commercial matrices to be used in biodiesel synthesis from different feedstocks. **Bioresource Technology**, n. 101, 2010, p. 5508-5516.

CARVALHO, E. A. S. **Caracterização estrutural e propriedades do acrilamidometil acetato proprionato de celulose**. Dissertação (Mestrado),

Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. 75p. Campos dos Goytacazes, 2008.

CARVALHO, E. A. S., SANCHEZ, R. J., TAVARES, M. I. B., LAMÔNICA, A. C. Characterization and properties of hydrophilic cellulose acetate propionate derivative. **Journal Polymer Environ**, n. 4, 2010, p. 661-667.

CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de Fatores Experimentais nos Resultados de Análises Termogravimétricas. **Química Nova**. N.18, 1995, p. 305-308.

CASTANHARO, J. A., MELLO, I. L., MARIA, L. C. S., COSTA, M. A. S., SILVA, M. R., OLIVEIRA, M. G. Preparação e Caracterização de microesferas poliméricas magnéticas à base de estireno, divinilbenzeno e acetato de vinila. **Revista Polímeros Ciência e Tecnologia**, v.XXII, n.3, 2012, p.303-309.

CAMPANA-FILHO, S. P., BRITTO, D. Kinetics of the thermal degradation of chitosan. **Thermochimica Acta**, n. 465, 2007, p. 73-82.

CANILHA, L., CARVALHO, W., SILVA, J. A. Biocatalisadores imobilizados. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento* ano IX, nº 6, 2006, p. 48-57.

CETINUS, S. A., ALTUN, G. D. Immobilization of pepsin on chitosan beads. **Food Chemistry**, n. 100, 2007, p. 964–971.

CRUZ, J. A., PACHECO, S. M. V., FURIGO, J. AGENOR. Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Esferas de Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação de Óleo de Mamona. In: **Congresso Brasileiro de Biodiesel**. Florianópolis. 2007.

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

COSTA, M. A. S., MARIA, L. C. S., MELLO, I. L., CASTANHARO, J. A., SILVA, M. R., OLIVEIRA, M. G. Preparação e Caracterização de microesferas poliméricas magnéticas à base de estireno, divinilbenzeno e acetato de vinila. **Revista Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 22, n.3, 2012, p.303-309.

COSTA, C. N., COSTA, M. A. S., MARIA, L. C. S., SILVA, M. R., SOUZA, F. G., MICHEL, R. Síntese e caracterização de copolímeros à base de metacrilato de metila e divinilbenzeno com propriedades magnéticas. **Revista Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 22, n.3, 2012, p.260-266.

CONTI, R., RODRIGUES J. P. R., MORAN, P. J. Biocatálise: Avanços recentes. **Química Nova**, n.5, 2001, p.672-675.

DABDOUB, M. J., BRONZEL, J. L. Biodiesel: Visão crítica do status atual e perspectivas na academia e na indústria. **Química Nova**, n. 3, 2009, p. 776-792.

DEBRASSI, A. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de derivados da quitosana para aplicação como sistemas de liberação de indometacina**. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, 129p. Itajai.

DEVI, S., DAVE, A. M., DESAI, P. D. Alcoholysis of salicornia oil using free and covalently bound lipase onto chitosan beads. **Food Chemistry**, n. 95, 2006, p. 193-199.

DUAN, X., EVANS, D., ZHANG, Q., MA, H. Effect of surface hydrophobicity/hydrophilicity of mesoporous supports on the activity of immobilized lipase. **Journal of Colloid and Interface Science**, 2006, p. 780-786.

DUARTE, E. L. **Estudo de Fases Termotrópicas por Microscopia Óptica, Medidas de Densidade, Entálpicas e Espalhamento de Raios X**. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo - USP, 134p. São Paulo, 2000.

FURIGO, A., SALVADOR, A., RIBAS, C., MASO, L., PALHAREZ, S. Biodiesel: Aspectos gerais e produção enzimática. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC. 27p. Santa Catarina, 2009.

FORRESTI, M. L., FERREIRA, M. L. Chitosan-immobilized lipases for the catalysis of fatty acid esterifications. **Enzyme and Microbial Technology**, n. 40, 2007, p. 769–777.

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.

GOMES, S., FRANÇOIS, M., ABDELMOULA, M., REFAIT, P., PELLISSIER, C., EVRARD, O. Characterization of magnetite in silico-aluminous fly ash by SEM, TEM, XRD, magnetic susceptibility, and Mössbauer spectroscopy. **Cement and Concrete Research**, n. 29, 1999, p. 1705-1711.

GONÇALVES, L. R. B., GIORDANO, R. L. C., RODRIGUES, D. S., MACEDO, G. P., SIOLVA, J. A. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, n. 60, 2012, p. 16-24.

GUPTA, M., VARANDANI, D., MONDAL, K. A bioconjugate of *Pseudomonas cepacia* lipase with alginate with enhanced catalytic efficiency. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2006, p. 1080-1086.

HASIRCI, N., AKSOY, E. A., AKSOY, S., KALKAN, N. A. Preparation of chitosan-coated magnetite nanoparticles and application for immobilization of laccase. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 123, 2011, p. 707-716.

HORTA, H. Z. A. Macromoléculas, Unidade Didáctica 1 , Ministério de Educación y Ciência, UNED Madrid, 1982, 129-135p.

HOSSEINZADEH, H. Chemical Modification of Sodium Hyaluronate via Graft Copolymerization of Acrylic Acid Using Ammonium Persulfate. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, V. 3, 2012, P. 756-761.

HUANG, J., LONG, S., JIANG, D., XIÃO, H., ZHOU, J. Immobilization of *Pycnoporus sanguineus* laccase on magnetic chitosan microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, n. 25, 2005, p. 15–23.

HRISTOV, J., FACHIKOV, L. An overview of separation by magnetically stabilized beds: State-of-the-art and potential applications. **China Particuology**, v. 5, n. 1-2, 2007, p. 11-18.

JUNIOR, O. A. C. M. **Preparação, modificação química e calorimetria do biopolímero quitosana**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 128p. Campinas, 1999.

KACZMAREK, H., ZAWADZKI, J. Thermal treatment of chitosan in various conditions. **Carbohydrate Polymers**, n. 2, 2010, p. 394-400.

KUMAR, R.N., PO P.L., ROZMAN H.D. Studies on the synthesis of acrylamidomethyl cellulose ester and its application in UV curable surface coatings induced by free radical photoinitiator. Part 1: Acrylamidomethyl cellulose acetate. **Carbohydrate Polymers**, n.64, 2006, p. 112-126.

KUNITA, M. H. **Enxertia de Metacrilato de Glicidila em Filmes Poliméricos por Processo com Fluidos Supercríticos**, Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Maringá- UEM.121p. Maringá, 2005.

KESKINLER, B., TANRISEVEN, A., BAYRAMOGLU, M., IMER, D. Y., AYDINER, C., DIZGE, N. Biodiesel production from sunflower, soybean, and waste cooking oils by transesterification using lipase immobilized onto a novel microporous polymer. **Bioresource Technology**, n.100, 2009, p. 1983-1991.

KESKINLER, B., DIZGE, N., TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**, n.44, 2009, p. 220-225.

JEONG, Y. G., AN, J., JEON, G. W. High performance cellulose acetate propionate composites reinforced with exfoliated graphene. **Composites: Part B**, n. 43, 2012, p. 3412-3418.

LAFUENTE, R. F., GUISÁN, J. M., MATEO, C., PALOMO, J. M., PESSELA, B. C. C., ORTIZ, C., TORRES, R. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida Antarctica* via adsorption on polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, n.39, 2006, p. 167-171.

LEONETI, A. B., ARAGÃO-LEONETI, V., OLIVEIRA, S. V. W. B. Glycerol as a by-product of biodiesel production in Brazil: Alternatives for the use of unrefined glycerol. **Renewable Energy**, n.45, 2012, p. 138-145.

LEE, Y., NOH, J., YI, S. Amino acid modified chitosan beads: Improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 57, 2009, p. 123–129.

LI, S., LIU, B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. **Biosystems**, n. 77, 2004, p. 25-32.

LI, Y., BAI, Y., LEI, L., YI, L., YANG, Y., XIA, C. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, n. 321, 2009, p. 252-258.

LI, Y., LI, G., ZHOU, Z. Immobilization of *saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, n.47, 2010, p. 21-26.

MANSUR, H. S., COSTA JR., E. S. Preparação e caracterização de blendas de quitosana/poli(álcool vinílico) reticuladas quimicamente com glutaraldeído para aplicação em engenharia de tecido. **Química Nova**, v. 31, n. 6, 2008, p. 1460-1466.

MACHADO, A. B. **Preparação e Caracterização de lípases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná – UFPR. 154p. Paraná, 2008.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lípases para a síntese enzimática de biodiesel**. Tese (doutorado) – Universidade Federal de São Carlos – UFSC. 225p. São Carlos, 2009.

MENDES, A. A., CASTRO, H. F., OLIVEIRA, P. C., GIORDANO, R. L. C. A aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n.5, 2011, p. 831-840.

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

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.

ORREGO, C. E., SALGADO, N., VALENCIA, J. S., GIRALDO, G. I., CARDONA, C. A. Novel chitosan membranes as support for lípases immobilization: Characterization aspects. **Carbohydrate Polymers**, n.79, 2010, p. 9-16.

PAL, A., KHANUM, F. Covalent immobilization of xylanase on glutaraldehyde activated alginate beads using response surface methodology: Characterization of immobilized enzyme. **Process Biochemistry**, n. 46, 2011, p. 1315-1322.

PEREIRA, E. B., CASTRO, H. F., AGNES, E. J., MONDARDO, R. M., AGUIAR, R. O. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lípase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. **Acta Scientiarum Technology**, n.1, 2010, p. 15-19.

PHILIPPOVA, O., BARABANOVA, A., MOLCHANOV. U., KHOKHLOV, A. Magnetic polymer beads: Recent trends and developments in synthetic design and applications. **European Polymer Journal**, n.47, 2011, p. 542-559.

QUEIRÓS, P., COSTA, M., CARVALHO, R. H. Co-combustion of crude glycerin with natural gás and hydrogen. **Proceedings of the Combustion Institute**, n. xxx, 2012, p. xxx-xxx.

RAVINDRA, P., CHAN, E., JEGANNATHAN, K. R. Physical and stability characteristics of burkholderia cepacia lipase encapsulated in k-carrageenam. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 58, 2009, p. 78-83.

RILLING, P., WALTER, T., POMMERSHEIM, R., VOGT, W. Encapsulation of cytochrome C by multilayer microcapsules. A model for improved enzyme immobilization. **Journal of Membrane Science**, n. 129, 1997, p. 283-287.

SALIS, A., PINNA, M., MONDUZZI, M., SOLINAS, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis**, n. 54, 2008, p.19-26.

SHAH, A. A., HASAN, F., HAMEED, A. Methods for detection and characterization of lipases: A comprehensive review. **Biotechnology Advances**, n. 27, 2009, p. 782-798.

SANTOS, E. M. S. **Modificação e caracterização da quitosana para uso como suporte em processos biotecnológicos**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. 164p. Campos dos Goytacazes, 2009.

SCHUTH, F., SALABAS, E. L., LU, A. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie**. n. 46, 2007, p. 1222-1244.

SELLIN, N. **Análise da superfície de polímeros pós-tratamento corona**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. 78p. Campinas, 2002.

SILVA, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lípase de *cândida antarctica* tipo B imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina A**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará – UFC. 97p. Fortaleza, 2007.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos. Sexta Edição. Rio de Janeiro: LTC, 78p. 2000.

SOUZA, D. **Estudo da Estabilidade Térmica de acetato Propionato de Celulose Modificado com Polihidroxicanoato de Cadeia Curta.** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. 126p. Campos dos Goytacazes, 2006

SOUZA, F. S. **Síntese e caracterização de copolímeros à base de estireno, divinilbenzeno e metacrilato de metila com propriedades magnéticas.** Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. 117p. Rio de Janeiro, 2006.

SVETLAN, Z. Physical, machanical, and antibacterial properties of chitosan/peo blend films. **Biomacromolecules**, 2008. ISSN 1525-7797. Disponível em: <HTTP://dx.doi.org/10.1021/bm800180k>.

TAN, T., LU, J., NIE, K., DENG, L., WANG, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**, n° 28, 2010, p. 628-634.

TAN, T., CAO, Z., LI, W., CHENG, Y., YIN, C., CHEN, B. Using silk woven fabric as support for lipase immobilization: The effect of surface hydrophicity/hydrophobicity on enzymatic acitivity and stability. **Biomass & Bioenergy**, 2010, p. 1-8.

TEIXEIRA, V. F. T. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. 79p. Campos dos Goytacazes, 2011.

TUZMEN, N., AKGOL, S. OZTURK, N., ÇORMAN, M. E., DENIZLI, A. Magnetic polymeric nanospheres as an immobilized metal affinity chromatography (IMAC) support for catalase. **Biochemical Engineering Journal**, n. 49, 2010, p. 159-164.

VITOLLO, M. **Aspectos da técnica de imobilização. Departamento de Tecnologia Bioquímica – Farmacêutica. Universidade de São Paulo – USP. São Paulo.**

XI, Z., WANG, W., WANG, H., FANG, S. Immobilized enzyme reactors in HPLC and its application in inhibitor screening: A review. **Journal of Pharmaceutical analysis**, n. 2, 2012, p. 83-89.

XIE, W., WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. **Biomass & Bioenergy**, n.36, 2012, p. 373-380.

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.

YEBO, L., REEDER, R. Turning Crude Glycerin into Polyurethane Foam and Biopolyols. **Agriculture and Natural Resources**, 2011, p. 1-4.

ZAIA, D. A. M., ZAIA, C. T. B. V., LICHTIG, J. Determinação de proteínas totais via espectrofotometria: Vantagens e desvantagens dos métodos existentes. **Química Nova**, n.21, 1998, p. 787- 793.

ZHANG, D., YUWEN, L., XIE, Y. Improving immobilization of lipase onto magnetic microspheres with moderate hydrophobicity/hydrophilicity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, n. 89, 2012, p. 73-78.