

**MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO
COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

Dezembro, 2009

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

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 Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Dezembro 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

59/2011

Santos, Érica Marques da Silva

Modificação e caracterização da quitosana para uso como suporte em processos biotecnológicos / Érica Marques da Silva Santos. – Campos dos Goytacazes, 2009.

xxi, 171 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, 2009.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodriguez.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos.

Bibliografia: f. 153-164.

1. Quitosana 2. Biotecnologia 3. Microcápsulas magnéticas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

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 Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Comissão Examinadora:

Dsc. Gustavo Wagner de Menezes(Engenharia e Ciências de Materiais) – IFF-RJ

Dsc. Ana Lúcia Diegues Skury(Engenharia e Ciências de Materiais) –
UENF/CCT/LAMAV

Dsc.Tereza Elígio (Engenharia e Ciências de Materiais) – UENF/CCT/LAMAV

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

Dedico este trabalho ao meu filho Gustavo, meu esposo Valdecir e aos meus pais Abelar e Adenir por todo o incentivo, confiança, apoio e carinho durante todo o tempo.

A meu filho Gustavo, como demonstração de amor e prova de que: querer é poder.

A meu esposo, amigo e companheiro por sua confiança, estímulo e apoio em todos os momentos.

A meus pais Abelar e Adenir, que sempre acreditaram em mim. E, me iniciaram no conhecimento e transmitiram a importância do saber e dignidade.

AGRADECIMENTOS

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

“Deus sabe ... Quando estou cansada e desencorajada por esforços que não deram frutos. Deus sabe quando tentei... Quando chorei por longo tempo com o coração cheio de angústia. Ele contou minhas lágrimas. Quando sinto que a vida está perdida e que muito tempo se perdeu Ele me conforta... Quando estou solitária e meus amigos estão muito ocupados para um simples telefonema Ele me acompanha... Quando sinto que já tentei de tudo e não sei por onde remeçar Ele tem a solução... Quando nada mais faz sentido e sinto frustrada e deprimida Ele tenta me mostrar respostas... Quando tudo parece mais brilhante e percebo uma luz de esperança, nesse momento Ele soprou nos meus ouvidos. Quando as coisas vão bem e tenho muito para agradecer Ele está festejando comigo... Quando algo me traz muita alegria e me sinto fortalecida Ele está sorrindo para mim... Quando tenho um propósito a cumprir e um sonho para seguir Ele abre meus olhos e me chama pelo nome... Onde eu estiver seja na alegria e na tristeza, mesmo que ninguém mais saiba, DEUS sabe...”

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

“A verdadeira vida não é constituída de currículos, homenagens ou mesmo conquistas que aumentam o nosso intelecto; mas sim de essência humana. A maior mensagem que posso deixar cravada na minha vida é a maneira pela qual vou vive-la. Minha vida será a sua homenagem.” Minha eterna gratidão!

Ao meu filho Gustavo pela compreensão da minha ausência e pouco tempo para dar-lhe atenção, é uma criança iluminada.

“A você que mesmo tão pequeno se mostrou um gigante, me ensinado que, quem ama não impõe limites ou condições. A você que, em cada despedida, deixava transparecer nos olhos a tristeza, apesar do esforço em esboçar um sorriso consolador. A você que minha eterna gratidão e amor. Você é a luz da minha vida, te Amo!!!

Ao meu esposo Valdecir, pelo carinho, companheirismo, compreensão e apoio, sabendo entender todas as vezes em que tive que ausentar mesmo estando perto.

“A você que esteve comigo todo esse tempo, que sofreu comigo a cada adeus e escutou as histórias mais mirabolantes da minha fase de deslumbramento, ficará eternamente em meus pensamentos e coração. A você, meu amor, que soube suportar com firmeza o tempo e a distância, constituindo um modelo de dedicação e fidelidade. A você que, em cada despedida, deixava transparecer nos olhos a tristeza, apesar dos lábios tentarem esboçar um sorriso consolador, devo a alegria deste momento. Agradeço pelos votos de confiança em mim depositados, que me fizeram crescer e não desistir no meio do caminho.” Amo você!!!

Aos meus pais Abelar, Adenir e meu irmão Éric, minha cunhada Jaqueline e meu sobrinho Lucas, pela paciência, apoio nos momentos difíceis, pelo amor e carinho sempre concedidos.

“A vocês que valorizaram meus sonhos, quando eu mesma não acreditava neles; que me encorajaram a ir mais adiante, quando o medo me fazia hesitar; que me aplaudiram e se emocionaram com cada batalha vencida, os meus mais profundos agradecimentos.

No mérito de minha conquista há muito de suas presenças.

Companhia, sorrisos, palavras e carinho foram expressões de amor profundo e armas desta vitória.

As alegrias de hoje também são suas. Meu carinho e minha gratidão.”

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

Aos professores do Laboratório de Materiais Avançados.

À Luciana Lezira paras análises de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

À Márcia Benzi pelas análises de IFTR, no IMA –UFRJ.

Ao Professor Marcelo Gomes pelas análises de fotoacústica.

À todos os funcionários do Laboratório de Materiais Avançados.

Aos colegas de curso, Camila, Karina pelas análises de permeabilidade, Djalma pelas análises de AFM e apoio na solução de problemas, Álvaro pelo apoio na realização dos experimentos, Paula pela prazerosa convivência.

“A todos vocês que estiveram comigo, nos dias mais anônimos, nas horas simples, a todos os pequenos gestos, as pequenas atenções; a todos que contribuíram para a construção desta vitória, o meu carinho, reconhecimento e gratidão.”

Aos meus amigos, Diego, Bruno, Sarah, Karine e Amanda pela compreensão, apoio e carinho durante todo tempo.

“A vocês que valorizaram meus sonhos, quando eu mesma não acreditava neles; que me encorajaram a ir mais adiante, quando o medo me fazia hesitar; que me aplaudiram e se emocionaram com cada batalha vencida, os meus mais profundos agradecimentos.

No mérito de minha conquista há muito de suas presenças.

Companhia, sorrisos, palavras e carinho foram expressões de amor profundo e armas desta vitória.

As alegrias de hoje também são suas. Meu carinho e minha gratidão.”

À minha prima e irmã, Dulce por estar sempre presente em minha vida, dando a meu filho carinho e amor de mãe e me ajudando a resolver os diversos imprevistos de acontecem.

À Myrian minha amiga e irmã de coração por estar sempre presente, dando ao meu filho todo carinho e amor de mãe.

Em especial à uma grande amiga, Elaine Carvalho pela amizade, companheirismo, hospitalidade e acolhida, estando sempre pronta a me ajudar, sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

“Depois de algum tempo a gente aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.” (William Shakespeare)

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	1
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES:.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	16
1.1-OBJETIVOS:.....	19
1.1.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	19
1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
1.2-JUSTIFICATIVAS:.....	20
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 – POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	21
2.2 - QUITOSANA.....	22
2.3 - FONTES DE QUITINA E QUITOSANA.....	24
2.4- ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITINA E QUITOSANA	25
2.5 – APLICAÇÕES GERAIS DA QUITOSANA	28

2.6 – MISTURAS POLIMÉRICAS	30
2.7 - COMPATIBILIDADE.....	31
2.8 – MISCIBILIDADE	33
2.8.1 - TERMODINÂMICA E MISCIBILIDADE	35
2.8.2 - BLENDS POLIMÉRICAS.....	36
2.8.2.1 - ASPECTOS GERAIS	36
2.8.2.2 - MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE BLENDS POLIMÉRICAS	37
A) BLENDS EM SOLUÇÃO:	37
B) MISTURA MECÂNICA:.....	38
C) MISTURA REATIVA:	38
D) MISTURA DE LÁTEX:	39
E) POLIMERIZAÇÃO <i>IN SITU</i> :.....	39
2.8.3 - MORFOLOGIA DE BLENDS POLIMÉRICAS:.....	39
2.8.4 - APLICAÇÕES GERAIS DE BLENDS POLIMÉRICAS A PARTIR DA QUITOSANA	42
2.9 - BLENDS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM OUTROS POLÍMEROS ...	43
2.9.1 - BLENDS DE POLIHIDROXIBUTIRATO /QUITINA E QUITOSANA.....	43
2.9.2 - BLENDS DE QUITOSANA COM ÉSTERES DE CELULOSE	45
2.9.3 - BLENDS DE QUITOSANA COM CELULOSE	48

2.10 – MATERIAIS MAGNÉTICOS	51
2.10.1 - CURVAS DE MAGNETIZAÇÃO.....	52
2.11 – BIODIESEL	54
2.11.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	55
2.11.2 – PROCESSOS CATALÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL.....	61
2.12 – BIOCATALISADORES	64
2.13 – IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS.....	64
2.14 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO.....	66
- LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE	67
- LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA	68
- ADSORÇÃO.....	68
- CONFINAMENTO EM MATRIZ OU EM CÁPSULAS.....	70
2.15– POLÍMEROS NATURAIS UTILIZADOS COMO SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO.....	74
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
3.1 – MATERIAIS.....	81
3.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA.....	81
3.2.1 – OBTENÇÃO DAS BLENDS POLIMÉRICAS.....	82
3.2.1.1 - PREPARAÇÃO DA QUITOSANA	82

3.2.2 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLIÓXIDO ETILENO.....	83
3.2.3 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLI(ETILENO - CO - ÓXIDO ETILENO) E POLI(ETILENO - CO - ÓXIDO ETILENO) MODIFICADO.....	84
3.3 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E BLENDA.....	85
3.3.1 - CARACTERIZAÇÃO POR FTIV.....	85
3.3.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	86
3.3.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV.....	88
3.3.4- ANÁLISE DE PERMEABILIDADE POR GRAVIMETRIA.....	88
3.3.5 - CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA.....	90
3.3.6 – CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	91
3.3.7 – CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	95
3.4 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA - NÚCLEO.....	97
3.4.1 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMAGNETITA (NÚCLEO).....	97
3.4.2 – PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE <i>SPRAY-DRYING</i>	97
3.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM O NÚCLEO DE NANO-MAGNETITA.....	100
3.5.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	100
3.5.2 – POROSIDADE.....	101

3.5.3 – MEDIDAS DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETÔMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE.....	102
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
4.1 – CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA.....	104
4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QUITOSANA	104
4.1.2 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DE QUITOSANA.....	106
4.1.3 – ESTRUTURA DA QUITOSANA: ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	107
4.1.4 – COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE DA QUITOSANA.....	108
4.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: BLENDS.....	109
4.2.1 – MORFOLOGIA DAS BLENDS.....	109
4.2.2 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA CRISTALINIDADE. .	116
4.2.3 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: INTERAÇÕES ENTRE AS FASES POLIMÉRICAS.....	117
4.2.4 – TRANSPORTE DE MASSA: PERMEABILIDADE	118
4.2.5 – DIFUSIVIDADE TÉRMICA	123
4.1.7 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TÉRMICA	125
4.2.7 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO E MECÂNICO DA QUITOSANA E SUAS BLENDS.	127
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS MAGNÉTICAS A PARTIR DA QUITOSANA OBTIDAS POR <i>SPRAY DRYING</i>	130

4.3.1 – ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.	131
4.3.2 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCAPSULAS PREPARADAS COM A TECNICA DE <i>SPRAY DRYING</i>	134
4.3.2 – POROSIDADE	140
4.4 – MICROCAPSULAS MAGNETICAS DE QUITOSANA FORMULADAS PELA TECNICA DE COAGULAÇÃO	143
4.4.1 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO.	143
4.4.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA E CARGA DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.	144
4.4.3 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS MICROCAPSULAS DE QUITOSANA E A BLENDAS COM PEO CONTENDO NÚCLEOS DE Fe_3O_4	146
4.4.4 - FORMULAÇÃO DE UM BIOCATALISADOR. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA, ATIVIDADE CATALÍTICA.....	148
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	151
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos polímeros: celulose, quitina e quitosana.	23
Figura 2 - Principal diferença entre as estruturas de celulose, quitina e quitosana.	25
Figura 3 - Representação do arranjo das cadeias poliméricas das quitinas conhecidas: a) α b) β e c) γ	26
Figura 4 - Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica dos polímeros: quitina (NHCOCH ₃), quitosana (NH ₂) e forma modificada (R).	27
Figura 5 - Derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação.	29
Figura 6 – Representação de um sistema de duas fases por DMA.	32
Figura 7 - Diagrama de fases para um sistema binário.	40
Figura 8 - Diagrama de fases para um sistema ternário demonstrando as curvas binodal e spinodal e o ponto crítico.	41
Figura 9 - Difração de raio – x dos filmes de PHB, α -quitina e quitosana, das blendas PHB/ α -quitina e PHB/quitosana: (a) PHB/ α -quitina; (b) PHB/quitosana.	43
Figura 10 - DMTA do PHB, α – quitina, quitosana e as blendas: (a) PHB/ α – quitina; (b) PHB/quitosana.	45
Figura 11 - Difratoogramas de CH/HPMC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of HPMC, (b) difratoogramas de CH/MC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of MC.	47
Figura 12 - Tensão “ <i>strangth</i> ” da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	48
Figura 13 - Módulo de armazenamento (e’) da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	49
Figura 14 - Módulo “ <i>loss</i> ” (E”) da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	49
Figura 15 - Dependência da temperatura dos valores da Tg δ para a celulose, quitosana e quitosana/celulose.	50
Figura 16 - Representação ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais anti - e ferromagnéticos.	52
Figura 17 - Esquema ilustrativo da movimentação das paredes de domínio de uma amostra desmagnetizada submetida a um campo externo variável.	53
Figura 18 - Representação qualitativa de um ciclo de histerese	53
Figura 19 - Esquema resumida da produção de biodiesel.	54
Figura 20 – TLC de 0 a 72horas da mistura reacional da reação de etanolise do óleo de soja para a produção de biodiesel.	58
Figura 21 – Estabilidade da lipase imobilizada por repetidos ciclos.	59
Figura 22 – 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)	60
Figura 23 – Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento <i>et al.</i> , 2004).	66
Figura 24 – Imobilização de enzimas sobre suporte.	68
Figura 25 – Método de imobilização de enzima por adsorção em um suporte inerte	69
Figura 26 – Representação esquemática da preparação do apoio e imobilização da lipase por adsorção (Xu <i>et. al.</i> , 2007).	70
Figura 27 – Imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento.	71
Figura 28 – Microscopia eletrônica (a) corte transversal (b) superfície, esferas de quitosana a 2,0%(m/v).	72
Figura 29 – Fotos da microscopia da lipase encapsulada com o núcleo líquido no meio rodeado por uma matriz de k-carragenina.	73
Figura 30 – Ilustração esquemática da preparação de aminoácidos modificando esferas de quitosana e imobilização de enzimas	75
Figura 31 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microcápsulas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído.	76
Figura 32 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microcápsulas magnéticas da quitosana (Huang <i>et. al.</i> , 2005).	76

Figura 33 – Microscopia eletrônica quitosana em pó (40 x), (b) FP / QUIT / GLU 0,025 (x 2000), (c) CA / Chit / GLU 0,025 (400 x), e (d) CA / Chit (1000 x) (Foresti et. al., 2007).....	78
Figura 34 – Micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana	79
Figura 35- Esquema ilustrativo do modo de varredura do AFM para a obtenção dos parâmetros de rugosidade	87
Figura 36 - Sistema tipo “copo de Payne” utilizado para medidas de transporte de massa.	89
Figura 37 - Difrátometro marca Shimadzu modelo XRD 7000, utilizado para as análises.	94
Figura 38 - Esquema do microfone de eletreto.....	95
Figura 39 - Processo para formulação das microcápsulas pela técnica de segam por pulverização (<i>spray drying</i>).....	99
Figura 40 - Magnetômetro de Amostra Vibrante marca OXFORD VSM, Modelo 3001 utilizado para as análise.....	103
Figura 41 - Imagens MEV da superfície do filme de quitosana (a) e da seção transversal do filme de quitosana (b).	105
Figura 42- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de quitosana com 20µm x 20µm de área.	105
Figura 43 - Microscopia de força atômica mostrando morfologia da superfície do filme denso de quitosana com 2µm x 2µm de área.	106
Figura 44- Difrátograma do filme de quitosana neutralizado.	106
Figura 45 - Espectro de infravermelho (ATR) da quitosana.	107
Figura 46 - Curva de tempo de retardo para o filme de quitosana utilizando água como permeante a diferentes temperaturas.....	108
Figura 47 – Imagens de MEV: (a) Superfície e (b) Seção transversal no filme de Q/PEO (80/20).	109
Figura 48 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PEO com 20µm x 20µm de área.	110
Figura 49 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PEO com 25µm x 25µm de área.	110
Figura 50- Imagens de MEV: (a) superfície e (b) seção transversal do filme de Q/ PE-B-80%-PEO (80/20).	111
Figura 51 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.	111
Figura 52 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.	112
Figura 53 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-B-50%-PEO (80/20) e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-50%-PEO.	112
Figura 54- Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com 20µm x 20µm de área.	113
Figura 55- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com 20µm x 20µm de área.	113
Figura 56 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-b-PEO-COOH e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-PEO-COOH.	114
Figura 57- Microscopia de força atômica mostrando a topografia do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.....	114
Figura 58 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.....	115
Figura 59 - Difrátograma dos filmes de quitosana pura (a), Q/PE-B-50%-PEO (b), Q/PE-B-80%-PEO (c), Q/PE-B-PEO-COOH (d) e Q/PEO (e).....	116
Figura 60- Espectros de infravermelho (ATR) da quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros PE-PEO.	118
Figura 61- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C	119
Figura 62- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PE-b-80%PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°	119
Figura 63- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a Q/PE-b-80%PEO-COOH nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C	120
Figura 64- Coeficiente de permeabilidade em escala logarítmica versus o inverso da temperatura	122

Figura 65- Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PEO.....	124
Figura 66 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO.	124
Figura 67 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO-COOH.....	125
Figura 68- Evolução da temperatura com o tempo para as blendas.....	126
Figura 69 - Curvas de DSC para os filmes de quitosana e suas blendas.....	127
Figura 70- Módulo de armazenamento (E') para a quitosana e blendas.....	128
Figura 71- Módulo de perda para quitosana e blendas.	129
Figura 72-Tangente de delta para quitosana e blendas	130
Figura 73- Análises termogravimétricas para as microcápsulas com núcleo de Fe_3O_4	132
Figura 74 - DTG das microcápsulas de quitosana com núcleo de magnetita	133
Figura 75 - Micrografia eletrônica de varredura das microcápsulas Q/ Fe_3O_4	134
Figura 76 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas – Q/ Fe_3O_4	135
Figura 77 - Modificação da quitosana com trifosfato de sódio (TPF)	135
Figura 78- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4	136
Figura 79 -Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4	136
Figura 80 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das micropátulas Q/PEO/ Fe_3O_4	137
Figura 81-Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/PEO/ Fe_3O_4	137
Figura 82- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b- PEO80/ Fe_3O_4	138
Figura 83 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/ Fe_3O_4	138
Figura 84 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO- COOH/ Fe_3O_4	139
Figura 85 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	139
Figura 86 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/ Fe_3O_4	141
Figura 87 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/TPF/ Fe_3O_4	142
Figura 88 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 (a) concentração 2% e (b) concentração 3%	143
Figura 89 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 /PEO (a) concentração 2% e (b) concentração 3%	144
Figura 90 - Curvas termogravimétricas das microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada com PEO.	145
Figura 91 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/ Fe_3O_4	146
Figura 92 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/PEO/ Fe_3O_4	147
Figura 93 - Imobilização da Lipase no suporte de quitosana (Biochemical Eng. J. v.25, 15-23, 2005).	148
Figura 94 - Morfologia da microcápsula CS- Fe_3O_4 -Gt-Lipase.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.....	115
Tabela 2 - Cristalinidade das blendas de quitosana.....	117
Tabela 3 - Tabela de coeficientes de permeabilidade das blendas (inéditos não disponíveis na literatura).....	121
Tabela 4 Energias de ativação da permeação a água para as blendas de quitosana.....	123
Tabela 5 - Propriedades térmicas das blendas obtidas através das propriedades fototérmicas.....	126
Tabela 6 - Temperaturas de fusão da quitosana e suas blendas.....	128
Tabela 7 - Parâmetros utilizados na obtenção de microcápsulas de quitosana.....	131
Tabela 8 - Porcentagem de magnetita e água nas microcápsulas.....	132
Tabela 9 - Dados de volume e área superficial para as microcápsulas.....	140
Tabela 10 - Atividade Enzimática por adsorção física.....	149
Tabela 11 - Atividade Enzimática por ligação covalente.....	149
Tabela 12 - Atividade Enzimática das solução de imobilização durante o período de imobilização.....	150

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações:

CH - Quitosana

AC – Acetato de celulose

AAc – Àcido acrílico

TPF – Tripolifosfato de pentasódico

PGA – poli-ácido glicólico

PLA – poli-ácido láctico

PCL – policaprolactona

PVA – poli-álcool vinílico

PEO- polioxido de etileno

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

DTG – Termogravimetria derivativa

CAP – propionato acetato de celulose

FTIV – Espectroscopia de infravermelho com transformado de fourier

CAB – butirato acetato de celulose

CO₂ – Dióxido de carbono

NH₂ – Amina primária

ΔG_m – energia livre de mistura

ΔH_m – entalpia de mistura

ΔS_m – entropia de mistura

GA – Grau de Acetilação

MM – Massa Molar

N₂ – Nitrogênio

RMN – Ressonância magnética nuclear

T_c – Temperatura de cristalização

T_g – Temperatura de transição vítrea

TG – Termogravimetria

TGA – Análise termogravimétrica

HCl – Ácido Clorídrico

T_m – Temperatura de fusão

ΔT – Variação de temperatura

PAMAM – Poliamidoamina

NaOH – Hidróxido de Sódio

MeOH – Metanol

Da - Dalton

GPC – Cromatografia de permeação em gel

M_v – Massa molar viscosimétrica

RESUMO

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. O biodiesel surge como uma alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, já que sua utilização pode garantir a segurança energética, a diminuição da poluição do ar, além de ser uma energia renovável.

Recentes pesquisas buscam produzir o biodiesel de forma sustentável e economicamente viável. Os estudos dão ênfase ao processo de biocatálise como forma de baixar os custos da produção de biodiesel.

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento do setor biotecnológico no Brasil, encontra-se o estudo de novos biocatalisadores com propriedades magnéticas utilizando diferentes polímeros de origem natural como suporte de enzimas a serem utilizados no processo de produção de bicompostíveis. Assim a quitosana, segundo polímero natural encontrado em maior quantidade na natureza, foi caracterizada e modificada fisicamente e quimicamente com o objetivo de avaliar seu potencial como suporte magnético da enzima Lipase a ser utilizada num reator assistido por campo magnético.

Foi modificada a quitosana pela adição do homopolímero polióxido de etileno (PEO) e os copolímeros PE-b-x%PEO contendo 50 e 80% do co-monômero PEO sem modificar e 80%PEO modificado parcialmente (PE-b-80%PEO-COOH). Ainda foi utilizado o trifosfato de sódio (TPF) para realizar a modificação química da quitosana.

Os filmes densos da quitosana, sem modificar e modificada, foram preparados pela técnica de *casting* e caracterizados utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FITV), análise dinâmico mecânico (DMA), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e determinada as propriedades de transporte destes materiais pelas técnicas gravimétrica e fotoacústica. Os resultados mais significativos indicaram a diminuição da cristalinidade da quitosana quando modificada com o PEO e seus copolímeros na

proporção 80/20 m/m, a formação de misturas homogêneas e diminuição do coeficiente de solubilidade (H) do vapor de água.

Os suportes a partir da quitosana e suas blends foram preparados utilizando as técnicas de *spray drying* e coagulação. As diferentes microcápsulas foram caracterizadas em termos de distribuição de tamanho, porosidade, morfologia e carga magnética.

As microcápsulas formuladas pela técnica de coagulação com a quitosana e a blenda Q/PEO (80/20 m/m) apresentaram a maior carga magnética (~50% m/m) de Fe_3O_4 e um comportamento magnético com uma reversibilidade elevada e não houve indução residual, sendo as microcápsulas de Q/PEO as que apresentaram a maior magnetização de saturação.

Os biocatalisadores foram formulados utilizando as metodologias de adsorção e de imobilização covalente da enzima Lipase K tanto no suporte de quitosana como da blenda Q/PEO.

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 e particularmente quando utilizado como suporte a blenda Q/PEO.

ABSTRACT

The growing concern over global warming at the beginning of the XXI century encourages discussions of new energy sources. Biodiesel is an alternative to petroleum based diesel and its derivatives its use can ensure less expensive energy and reducing air pollution, Moreover, biodiesel is a renewable type of energy.

Recent research works are seeking to produce biodiesel in a sustainable and economically viable manner. Studies emphasize the process of catalysis as a way to lower the cost of biodiesel production.

Among the prospects for development of the biotechnology sector in Brazil, the study of new biocatalysts with magnetic properties is a priority. In the case different polymers of natural origin as a support for enzymes are used in the production of biofuels. Thus chitosan, a natural polymer found as the second largest amount in nature, was characterized physically and chemically modified in order to evaluate its potential as a magnetic medium of the enzyme lipase to be used in a reactor assisted by magnetic field.

Chitosan was modified by the addition of polióxido ethylene homopolymer (PEO) and PE-b-x%PEO copolymers containing 50% PEO and 80% of co-monomer PEO and 80% partially modified PEO (PE-b-PEO-COOH 80%). It was also used the sodium triphosphate (TPF) to perform chemical modification of the chitosan.

The dense films of both pure and partially modified chitosan, were prepared by casting technique and characterized using the techniques of scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), dynamic mechanical analysis (DMA), and differential scanning calorimetry (DSC). The transport properties of these materials were determined by gravimetric and photoacoustic techniques. The most significant results indicated a decrease in crystallinity of the chitosan when modified with PEO and its copolymers in proportion 80/20 w / w. The formed mixtures were homogeneous and presented decreased solubility coefficient (H) of water vapor.

The supports from chitosan and its blends were prepared using both the spray drying and coagulation technique. The different microcapsules were characterized in terms of size distribution, porosity, morphology and magnetic charge.

The microcapsules made by the coagulation technique with chitosan blend and Q / PEO (80/20 w / w) showed the greatest magnetic charge (~ 50% w / w). It

also presented a Fe_3O_4 magnetic behavior with a high reversibility and no residual induction, The microcapsules Q / PEO were those that had the highest saturation magnetization.

The biocatalysts were formulated using the methods of adsorption and covalent immobilization of the enzyme Lipase K both in support of the blend of chitosan as Q / PEO.

The catalytic tests, carried out in a preliminary way using an emulsion of oil, water and gum Arabic, showed a higher catalytic activity for the covalently immobilized enzyme this was particularly the situation when used as support for blend Q / PEO.

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. Em todo o mundo já se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, que causariam um impacto muito menor no aquecimento do planeta (Gonçalves et. al., 2005). O biodiesel ganhou importância pela sua capacidade de substituir os combustíveis fósseis (Muthu, 2008).

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

Recentes pesquisas buscam produzir o biodiesel de forma sustentável e economicamente viável. Os estudos dão ênfase ao processo de biocatálise como forma de baixar os custos da produção de biodiesel.

O uso de enzimas como catalisadores da reação de transesterificação para produção de Biodiesel, tem se tornado uma opção bastante atrativa, devido a especificidade das enzimas e dos benefícios ambientais e econômicos decorrentes da utilização deste biocombustível.

O desenvolvimento de novas técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (Nascimento et. al., 2004).

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 (Nascimento et. al., 2004).

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (Nascimento et. al., 2004).

Polímeros naturais têm sido utilizados para imobilização de enzimas em vários estudos (Murat, 1995). Polissacarídeos representam o grupo mais utilizado entre eles, por contribuir para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalizador, criando um micro-ambiente favorável e mantendo dessa forma, a atividade enzimática (Nascimento et al., 2007).

A quitosana vêm sendo estuda e aplicada no processo de imobilização de enzimas, uma vez que possui características interessantes para sua utilização como: biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade.

Microcápsulas de quitosana vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de melhorar suas propriedades de adsorção. A versatilidade deste polímero permite a preparação de microcápsulas de diferentes formas e tamanhos, envolvendo diversos produtos e derivados. O uso de quitosana porosa em partículas apresenta inúmeras vantagens no processo de imobilização de enzimas.

O presente trabalho tem como objetivo a formulação e caracterização de microcápsulas magnéticas de quitosana para atuarem como suporte em processos de produção de biodiesel.

Foram formuladas microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada e, estas foram caracterizadas utilizando diversas técnicas de análise, quantitativa, qualitativas e morfológicas.

1.1-OBJETIVOS:

1.1.1 - OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Promover a modificação da quitosana procurando novas propriedades.
- ✓ Formulação e caracterização de filmes densos a partir de quitosana modificada com potencial uso biotecnológico.
- ✓ Formulação e caracterização de microcápsulas com núcleo magnético para uso na área biotecnológica.

1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Formular e caracterizar blendas das quitosanas procurando modificar cristalinidade e hidrofiliidade preservando a funcionalidade NH.
- ✓ Formular e caracterizar microcápsulas contendo como núcleo nanomagnetita e uma superfície irregular que propicie a imobilização de enzimas e células para a produção de biodiesel.

1.2-JUSTIFICATIVAS:

O desenvolvimento de novos materiais que possuam propriedades específicas e que por sua vez contribuam ao desenvolvimento sustentável é o foco principal na atualidade de cientistas e ambientalistas.

Assim a utilização de polímeros naturais como a quitina e seu derivado a quitosana obtido a partir da desacetilação, vem sendo objeto de estudo, para sua aplicação em diversas áreas. Embora possa ser sintetizada é considerado um polímero natural, tendo em vista que sua principal fonte de obtenção é a quitina, que por sua vez é um dos polissacarídeos naturais mas abundantes na natureza, perdendo apenas para a celulose.

A utilização da quitosana para o desenvolvimento de novos materiais se torna atrativa no sentido de que a quitosana pode ser obtida a partir de recursos renováveis, como a partir da carapaça de crustáceos de onde se obtém a quitina que depois de processada se transforma em quitosana.

A produção de quitina tem aumentado de forma considerável no Brasil, isto viabiliza seu uso

Além desta vantagem a quitosana apresenta baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade entre outras propriedades que permitem sua utilização na área biotecnológica.

Por outro lado existe uma crescente preocupação com a necessidade de um desenvolvimento sustentável o que tem sido um incentivo adicional a pesquisa científica, principalmente no Brasil, no sentido de utilizar combustíveis renováveis, como o biodiesel, sendo uma alternativa para substituição de combustível fósseis e preservação do meio ambiente.

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

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Os polímeros biodegradáveis são classificados em duas categorias, baseada na fonte de obtenção; ou seja, rotas sintéticas ou naturais, incluindo plantas e microrganismos.

A primeira consiste de polímeros sintéticos obtidos em laboratório, onde grupos susceptíveis ao ataque enzimático são previamente programados para fazer parte de sua estrutura, como no caso dos poliésteres alifáticos. Estes são facilmente biodegradados e vários exemplos já são conhecidos e utilizados, tais como o poli-ácido glicólico (PGA), o poli-ácido láctico (PLA), copolímeros do PLA/PGA e a policaprolactona (PCL).

Outros polímeros sintéticos também conhecidos como susceptíveis à biodegradação são o poli-álcool vinílico (PVA) e o poli-óxido de etileno (PEO) (Verhoogt, 1994).

A segunda rota de obtenção de polímeros biodegradáveis é a natural, onde estão contidos alguns microrganismos e plantas. Dentre as plantas podemos citar a celulose e o amido que existem em grande abundância na Terra e são bem conhecidos pelo homem. Entretanto, outras fontes naturais, como os microrganismos, têm se revelado promissoras.

A biodegradação de polímeros ocorre geralmente por hidrólise e oxidação. Vários fatores como a presença na cadeia principal de determinados grupos funcionais, ligações hidrolisáveis e/ou oxidáveis, natureza dos substituintes, estereo configuração, grau de hidrofobicidade ou hidrofiliicidade, e flexibilidades conformacional influenciam a biodegradabilidade dos polímeros (Huang e col., 1995).

É importante chamar a atenção sobre o processamento de polímeros naturais, tais como celulose e amido. Como a celulose possui uma alta somatória de energia de interação, por pontes de hidrogênio entre as cadeias, ela não dissolve em solventes comuns e degrada antes de sofrer a fusão como outros termoplásticos convencionais. Assim, ela deve passar por modificação estrutural, como a introdução de grupos laterais na cadeia, de modo a diminuir esta alta energia de interação e ser

processada. Exemplos disso são os ésteres de celulose, que podem ser processados como um polímero termoplástico, uma vez que a temperatura de fusão foi reduzida significativamente abaixo do ponto de degradação devido a introdução dos grupos ésteres na cadeia. Semelhante à celulose, o amido deve ser modificado antes de ser processado, porém deve-se ter cuidado para que sua modificação não coloque em risco seu grau de biodegradação (Maddever,1990).

2.2 - QUITOSANA

A quitosana é obtida da quitina que é um polissacarídeo natural muito importante. Considerando a quantidade de quitina produzida anualmente no mundo, é o maior polímero em abundância após a celulose. A quitina é sintetizada por um número enorme de organismos vivos e é encontrada principalmente, no exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo e lagosta.

O derivado mais importante da quitina é a quitosana, obtida pela desacetilação da quitina. A quitosana é um produto natural não-tóxico e, devido à presença dos grupos $-NH_2$ e $-OH$ na estrutura do polímero, possui características que lhe conferem uma ampla aplicação.

Atualmente a quitosana vem sendo utilizada no tratamento de águas, produção de cosméticos, drogas e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semi permeáveis e no desenvolvimento de biomateriais. Na presença de soluções diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, constituído de um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopirranose de composição variável em função do grau médio de acetilação, GA , que representa a fração de unidades e é um dos principais parâmetros para sua caracterização.

As estruturas da celulose, da quitina e da quitosana são mostrada na Figura1.

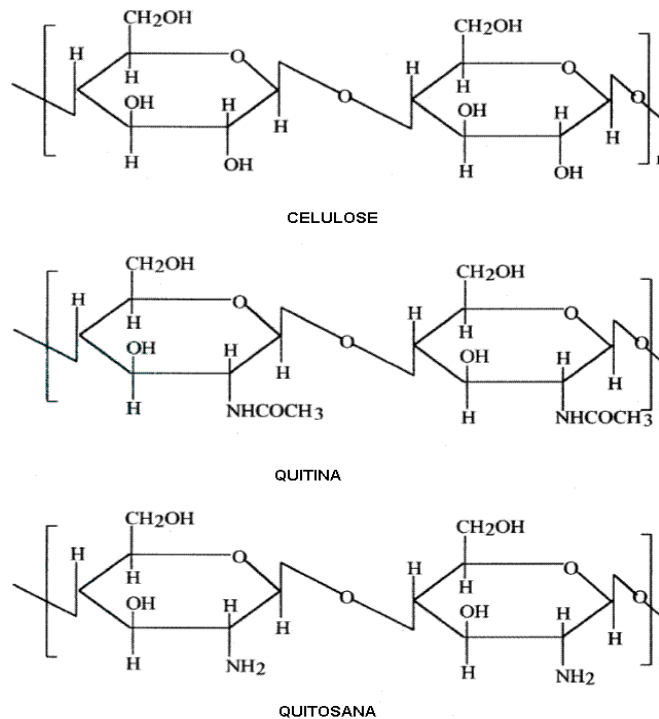


Figura 1 – Estrutura dos polímeros: celulose, quitina e quitosana.

Atualmente os polímeros naturais tais como a celulose, quitina e quitosana e seus derivados possuem maior degradabilidade e biocompatibilidade, quando comparados com a maioria dos polímeros sintéticos encontrados nos dias de hoje.

Entretanto, estes materiais naturalmente abundantes exibem limitações em relação à reatividade e processabilidade. A quitina e a quitosana são indicadas como materiais funcionais apropriados, por possuírem propriedades excelentes, tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade e propriedades de adsorção, entre outras.

Recentemente, muita atenção foi dada a quitosana com um polissacarídeo em potencial. No entanto, embora tenha sido feito grandes esforços com a finalidade de preparar derivados funcionais da quitosana, através de modificações químicas, poucos foram os sucessos alcançados, com relação a solubilidade em solventes orgânicos em geral e em alguns sistemas de solvente binários. A quitina e a quitosana quimicamente modificadas têm como resultado uma melhora na solubilidade com relação a solventes orgânicos em geral.

2.3 - FONTES DE QUITINA E QUITOSANA

Quitina e quitosana são biossintetizados e biodegradados na biosfera terrestre. Com estimativa anual de 100 bilhões de toneladas por ano, bem distribuídos na natureza sem haver um excesso de acúmulo.

A quitina é um dos materiais orgânico mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Por outro lado, a quitosana não é muito encontrada como material natural em si, quando comparada à quitina e à celulose, ocorrendo muito dispersamente em alguns microorganismos. Por isso, devido à baixa ocorrência natural, a quitosana é normalmente obtida por desacetilação da quitina natural. Contudo, a quitosana assim obtida ainda é considerada como um biopolímero natural.

A quitina é amplamente distribuída na natureza, sendo maior componente estrutural do exoesqueleto dos invertebrados marinhos, cuja quantidade relativa varia de 30 a 60% nos crustáceos (cuja a quantidade relativa varia de 30 a 60%) nos crustáceos) e da cutícula dos insetos, como também é encontrada na parede celular de alguns fungos e leveduras.

A quitina funciona como um componente fibroso na estrutura do exoesqueleto, cutícula e parede celular dos organismos nos quais ocorre. Desta maneira, ela é quase sempre encontrada associada às proteínas, formando oligoproteínas que funcionam como matrizes que interagem com outros constituintes, como os taninos fenólicos na cutícula dos insetos e os minerais no exoesqueleto dos crustáceos.

Embora esteja bastante difundida na natureza, no momento a fonte economicamente mais viável para a obtenção da quitina, e conseqüentemente da quitosana, tem sido os refugos industriais do processamento de crustáceos, destacando-se entre eles, já em larga escala, os caranguejos, camarões e lagostas.

Devido ao aumento acelerado o interesse científico principalmente industrial em quitina e quitosana, outras fontes destes materiais foram avaliadas como, por exemplo, extração de quitina do fungo utilizado na produção do ácido cítrico. (referencia). Os investigadores acreditam que nos futuros os microorganismos serão uma das principais fontes de quitina e quitosana.

Entretanto, estas e outras novas fontes testadas ainda não têm demonstrado viabilidade econômica, devido ao alto custo, além de problemas técnicos e científicos, encarecendo o produto final. Contudo, as fontes naturais no momento são basicamente os resíduos de crustáceos, que ainda mostram suficiência no suprimento da demanda mundial.

Entretanto, para evitar problemas futuros, até mesmo de ordem bioecológica, cada vez mais crescem as investigações em busca de novas fontes e tecnologias adequadas para obtenção de quitina e de quitosana.

2.4- ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um biopolímero de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-amino-dioxi-D-glicopiranosose, unidades interligadas por ligações glicosídicas (1 → 4) glucosamina, formando um polissacarídeo cristalino representado pela fórmula geral $[C_8H_{13}O_5N]_n$. Normalmente é denominado poli[β (1→4)-N-acetil-D-glucosamina] ou N-acetilglucosamina. (referencia) Sua massa molecular é estimada de 1 a 2×10^6 Dalton.

A estrutura química da quitina é muito semelhante à da celulose. A principal diferença entre elas se encontra no tipo de grupamento situado na posição axial no carbono 2 do anel de piranosose. No carbono da celulose encontra-se uma hidroxila, enquanto na quitina tem-se um grupamento mais volumoso que é uma acetamida (-NHCOCH₃), esta diferença pode ser melhor visualizada na figura abaixo

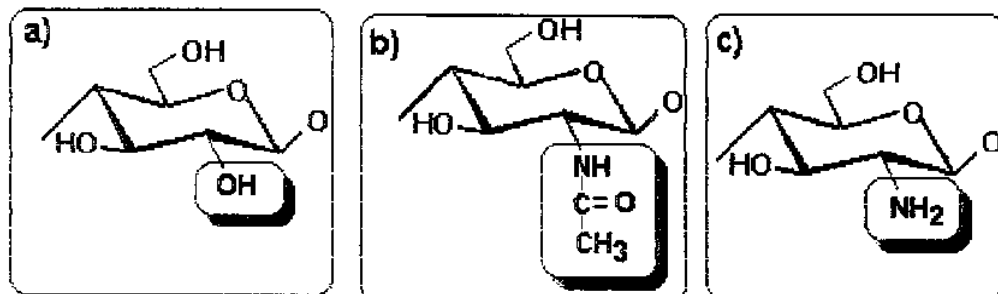


Figura 2 - Principal diferença entre as estruturas de celulose, quitina e quitosana.

A quitina é conhecida em três formas estruturais diferentes, α -, β e γ , mostradas na Figura 3. Destas as α -, β - quitinas, são as mais conhecidas, sendo a

α -quitina a mais comum e por isso também é a mais estudada. A estrutura da γ -quitina é muito pouco conhecida devido à rara ocorrência e formação natural.

A quitina é biodegradável, não-tóxica, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. É despolimerizada na presença de ácidos minerais fortes, sendo parcialmente solúvel em solução de dimetilacetamida com 5% cloreto de lítio

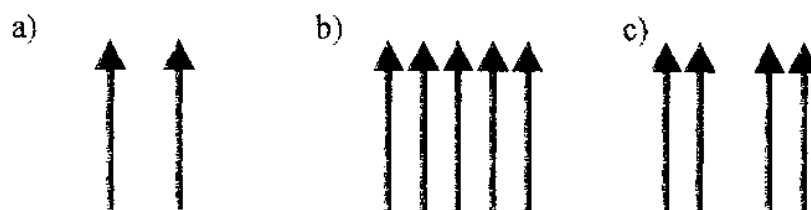


Figura 3 - Representação do arranjo das cadeias poliméricas das quitinas conhecidas: a) α b) β e c) γ

A quitina poli[β (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-dioxi-D-glicopirranose] é um biopolímero obtido normalmente pela desacetilação química da quitina, sendo representada pela fórmula geral $[C_8H_{11}O_4N]_n$. É normalmente denominada de poli[β (1 \rightarrow 4)-N-cetil-D-glucosamina] ou N-glucosamina, portanto, assemelha-se quimicamente ao biopolímero original quitina.

A quitosana possui no carbono 2 uma amina primária ($-NH_2$), como mostra a Figura 1. Esta diferença faz com que a quitosana tenha certas características químicas e físicas diferentes da quitina e da celulose, que na maioria dos casos são consideradas bem mais interessantes como, por exemplo, o fato de ser um polieletrólito, possuir melhor solubilidade, reatividade, etc. (Hirano, 1996).

A quitosana é solúvel em muitos ácidos orgânicos e em soluções ácidas cujo pH seja acima de 6,5.

O grupo amina presente na quitosana possui um pKa em torno de 6,2 a 7,0 o que torna um polieletrólito quando dissolvida em meios cujo pH seja mais baixo. (Azevedo, 2004).

A quitina e a quitosana são uns dos poucos polieletrólitos catiônicos naturais. Diferente dos outros polissacarídeos naturais, que se apresentam neutros ou negativamente carregados. A quitosana dispõe de grupos aminos que reagem com certa facilidade, o que permite a obtenção de muitos compostos derivados.

A quitina, a quitosana e seus derivados são considerados polímeros heterogêneos, porque possuem na cadeia polimérica tanto monômeros acetilados quanto desacetilados, conforme mostra a Figura 4, isto porque, as formas totalmente acetiladas ou desacetiladas, respectivamente, não ocorrem normalmente na natureza e são de difícil preparação e laboratório. (Muzzarelli, 1997).

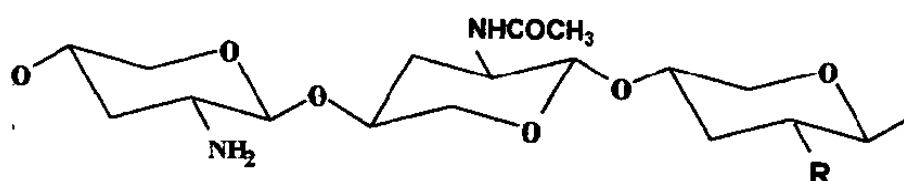


Figura 4 - Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica dos polímeros: quitina (NHCOCH₃), quitosana (NH₂) e forma modificada (R).

A análise elementar da quitina mostra a presença de moléculas de água incorporadas ao polímero. (Muzzarelli, 1997). Alguns pesquisadores estimam que a quitina é constituída de 82,5% de unidades acetiladas, 12,5% de unidades desacetiladas e 5% de água.

De um modo prático, a quitina e a quitosana podem ser distintos pelo critério de solubilidade em solução aquosa de ácido diluído. Quando o polímero possui alto teor de grupos N-acetil ($\geq 40\%$) distribuídos na cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel, sendo denominado de quitina. Quando os mesmos grupos são menores que 40%, este polissacarídeo passa a ser solúvel em solução aquosa de ácido diluído, é então denominado de quitosana. (Peter, 1995).

A dissolução da quitosana em solução aquosa de ácido diluído não se deve apenas ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos N-acetil presentes na quitina, mas também, às propriedades hidrofílicas das unidades de glucosamina (Glc – NH₂), que em pH abaixo de 6 são protonadas levando a um equilíbrio, conforme mostra a equação (1).



A solubilidade de quitosana em solução aquosa de ácido diluído está relacionada principalmente com o grau de N-acetilação (GA) ou N-desacetilação (GD) deste biopolímero.

Portanto, a solubilidade da quitosana pode ser associada à vários fatores: quantidade de grupos N-acetil (NCOCH_3) e de grupos amina (NH_2), distribuição destes grupos na extensão da cadeia polimérica, pH e força iônica da solução.

2.5 – APLICAÇÕES GERAIS DA QUITOSANA

Atualmente a utilização da quitina e de seus derivados em escala industrial ainda é muito menos importante que o uso da celulose, mas alguns importantes seguimentos do mercado empregam derivados da quitina. Dentre estes derivados destaca-se a quitosana.

A grande potencialidade de aplicação em diversas áreas (biomédica, alimentícia, agricultura, tratamento de água, cosméticos e fármacos) juntamente com seu baixo custo e suas propriedades – como biodegradabilidade e baixa toxicidade – têm intensificado as pesquisas com a utilização da quitosana e a sua modificação química.

Dessa forma, o número de publicações relacionadas à quitina e quitosana teve um acréscimo exponencial de aproximadamente 480 artigos no início dos anos 1970 para 9500 artigos no período 2000-2008.

Muitas das pesquisas de aplicação da quitosana encontram-se na área de catálise mostrando suas vantagens na catálise heterogênea como suporte em que a principal vantagem é a recuperação do catalisador ao final da reação, sobretudo quando este agrega um alto valor.

As primeiras referências da quitosana como suporte catalítico foram citadas no início dos anos 80 para a preparação de catalisadores na hidrogenação. Recentemente, catalisadores de quitosana modificada têm sido preparados para diferentes reações como: reação de oxidação, ciclopropanação de olefeínas, reação de carbonilação, entre outras. Verifica-se também referências de catalise heterogênea com o uso direto da quitosana como catalisado pela sua funcionalidade natural, como na síntese de monoglicerídeo.

As modificações na estrutura da quitosana para formar derivados com características adequadas e propriedades ampliadas geralmente envolvem os grupos – NH_2 e – OH presentes nas cadeias dos polímeros.

Alguns exemplos de derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação estão exemplificados na Figura 5. Dentre os derivados da quitosana destacam-se os sais de quitosana que carregam cargas positivas permanentes nas cadeias do polímero devido à quartenização dos átomos de nitrogênio do grupo amina. Devido as características ácidas destes sais também pode ser investigado seu uso na catálise.

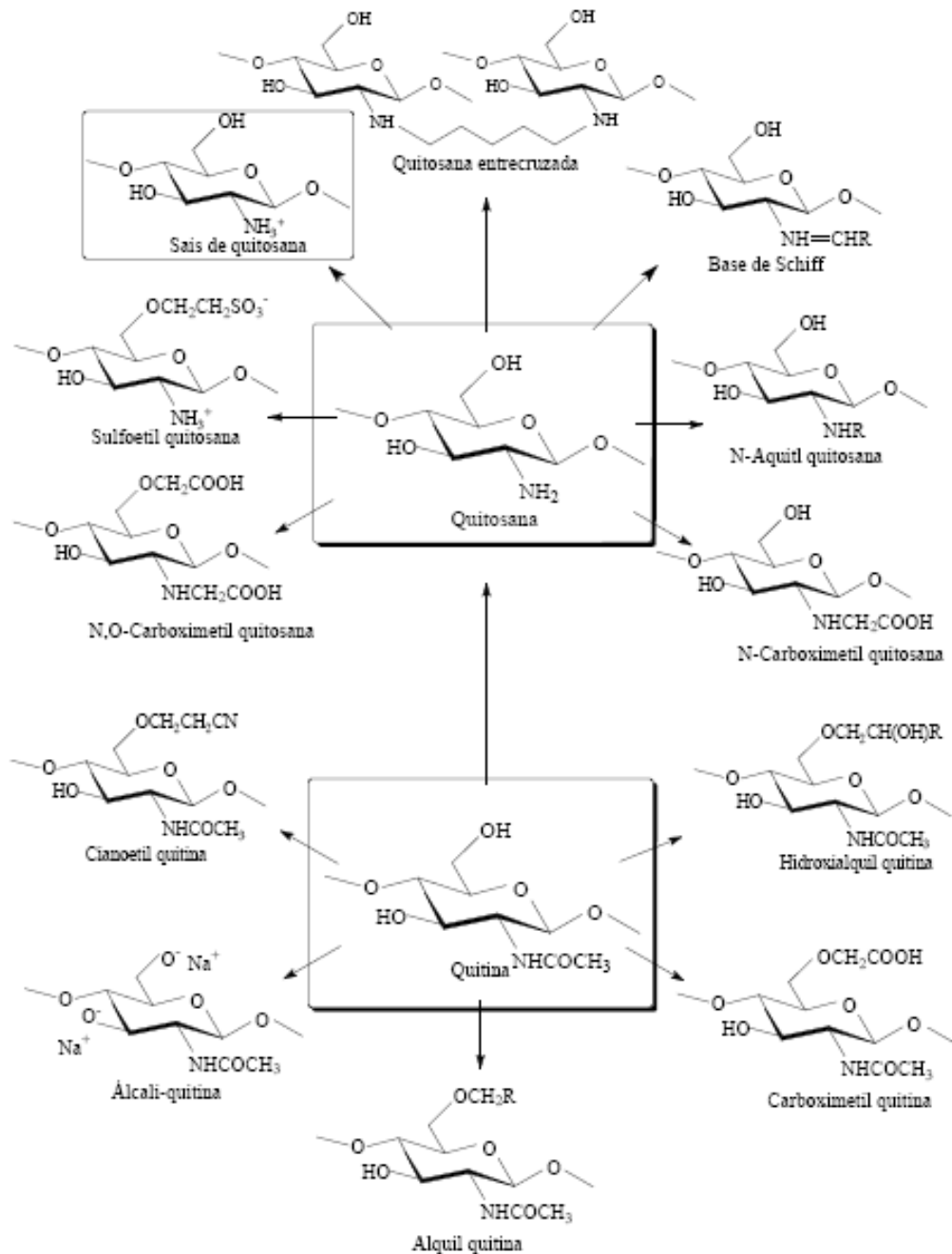


Figura 5 - Derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação.

2.6 – MISTURAS POLIMÉRICAS

A pesquisa para obtenção de novos materiais, através de modificações de polímeros já conhecidos ou da mistura de polímeros, tem mostrado novas direções para a produção de materiais economicamente viáveis e com propriedades desejáveis. (Cypriano, 2005)

O fenômeno de misturar materiais é conhecido desde idades pré-históricas, quando ligas de novos metais deram origem a outros materiais como o bronze. Desta forma, dois ou mais polímeros podem ser misturados para resultar produtos com propriedades desejáveis, porém a idealidade raramente é atingida devido a alguns problemas inerentes e fundamentais.

Grande parte dos pares de polímeros que entram na mistura, não é termodinamicamente miscível e, assim, existem duas fases distintas na mistura final. A não miscibilidade resulta em uma interface que pode conduzir a um baixo desempenho do sistema resultante. Por exemplo, uma alta tensão interfacial e pobre adesão entre as duas fases numa mistura, podem levar à redução do grau de dispersão e a separação total durante o processamento ou o uso.

Essa baixa adesão também é responsável por propriedades mecânicas fracas devido à pobre transferência de energia entre as fases, além de impedir a formação de estruturas definidas morfologicamente (Camargo, 2003).

Sistemas poliméricos com dois ou mais componentes são divididos em:

- a) mistura de polímeros (Blendas),
- b) copolímeros
- c) compósitos.

Este trabalho se dedicou à mistura de polímeros ambientalmente degradáveis (EcoBlendas), sistemas em que os polímeros são misturados mecanicamente, sem interações químicas efetivas, como ocorre com copolímeros. Porém, uma melhor dispersão pode ser esperada em copolímeros (em bloco) do que num sistema de mistura que tem os mesmos pares do polímero. Mesmo assim, foi observado que quase todos os copolímeros exibem também algum grau de separação de fase (Camargo, 2003).

2.7 - COMPATIBILIDADE

Compatibilidade é comumente usada para descrever uma mistura completa em nível molecular. Porém, quando temos macromoléculas ou polímeros, as dimensões moleculares são bem maiores e o termo “compatibilidade” deve ser usado com cautela. Por definição, muitos sistemas poliméricos heterogêneos podem ser definidos como compatíveis, embora eles mostrem um certo grau de separação de fases e transições vítreas bem distintas (T_g).

A compatibilidade, ou homogeneidade de uma mistura de polímeros, pode somente ser definida em função das dimensões moleculares da separação de fases, que geralmente podem ser caracterizadas por diferentes técnicas de medida como, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Mecânico Dinâmico (DMA), Análise Termogravimétrica (TGA), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), dentre outras. Conseqüentemente, compatibilidade é tratada como um termo relativo e pode ser definida por um número de compatibilidade, denominado N_c , definido por (Camargo, 2003):

$$N_c = \frac{\text{Tamanho da sonda experimental}}{\text{Tamanho do domínio de Fases}} \quad (2)$$

O tamanho da sonda experimental pode ser a escala de resolução de um instrumento técnico. O tamanho do domínio é a dimensão dispersa na fase de uma blenda.

Assim:

- i) quando $N_c \rightarrow \infty$ (sistema é compatível)
- ii) quando $N_c \rightarrow 1$ (sistema é semi compatível)
- iii) quando $N_c \rightarrow 0$ (sistema é incompatível)

Na Figura 6, tem-se uma representação esquemática de um sistema de duas fases, que ilustra a definição de um sistema compatível, incompatível e semi compatível usando DMA.

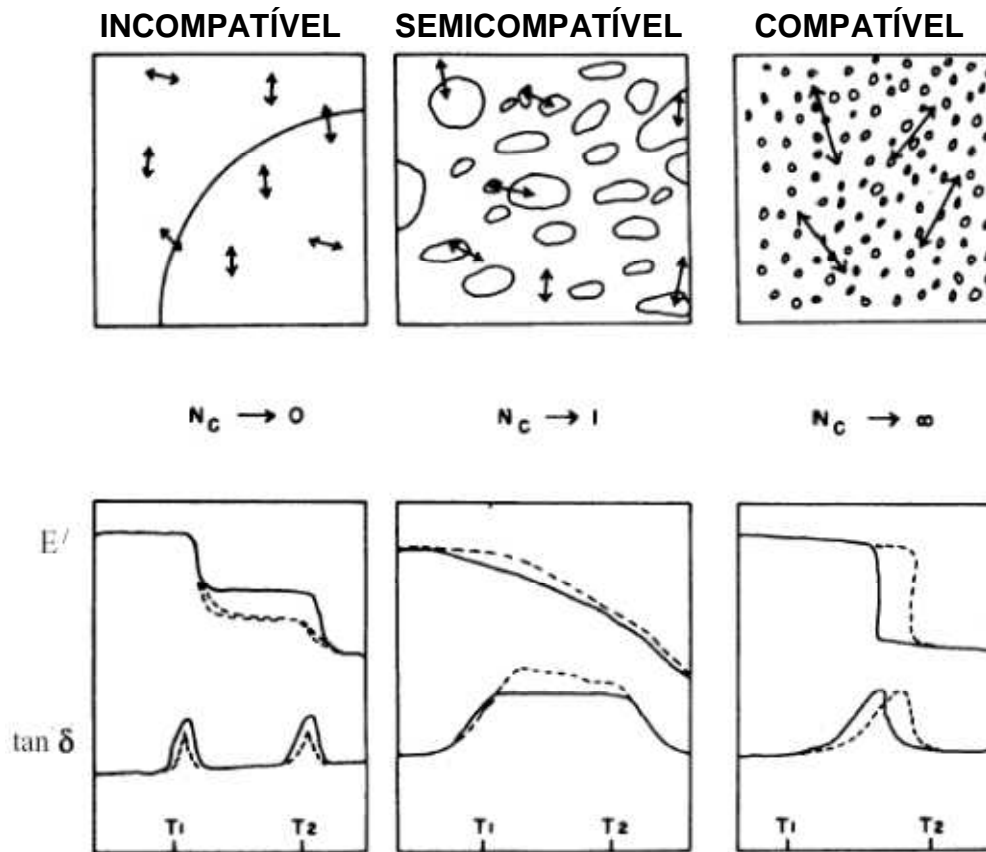


Figura 6 – Representação de um sistema de duas fases por DMA.

Quando N_c chega a zero, a dimensão de cada fase existente, num sistema bifásico, é muito maior que o tamanho da sonda do instrumento e, assim, este pode detectar duas transições que correspondem a cada fase. Em outras palavras, duas Tg's distintas serão observadas.

Para o caso compatível (N_c chega a ∞), o tamanho de sonda é muito maior que as dimensões de fase e, assim, o instrumento não pode detectar flutuações pequenas na composição. Com isso, apenas uma única Tg média, correspondendo aos dois componentes, será medida.

Para o caso semi compatível, um grande efeito é observado e a curva de $\tan \delta$ tem uma larga faixa de temperaturas, desde a mais baixa até a mais alta, correspondentes às transições associadas a cada componente. Assim, o registro de

uma única ou de duas transições, no DMA, dá uma indicação das dimensões moleculares ou número das fases presentes no sistema.

A dimensão (domínio) que corresponde na análise dinâmico-mecânica (DMA) é aproximadamente 15 nm. A técnica de RMN pode detectar outras flutuações na composição ou na variação dimensional que chega a 2,5-5 nm.

2.8 – MISCIBILIDADE

Na literatura tecnológica o termo “miscibilidade” é usado para definir a interação entre pares de polímeros, em nível molecular. Portanto, miscibilidade não é sinônimo de compatibilidade. Compatibilidade é usada para caracterizar a facilidade relativa de obtenção ou o desempenho dos polímeros em uma mistura.

Os componentes da blenda podem ter uma segregação de fases, podem não ser miscíveis sobre o ponto de vista termodinâmico, mas se houver propriedades desejáveis na blenda ela é considerada compatível (Camargo, 2003).

Um aspecto determinante das propriedades das blendas é a miscibilidade. As blendas são definidas em duas classes distintas: *blendas miscíveis*, quando apresentam homogeneidade em escala molecular, associada a valores negativos de energia livre de mistura, ΔG_m , e *blendas imiscíveis*, quando o material apresenta duas ou mais fases apresentando valores positivos de ΔG_m (Ultracki, 1998).

Uma outra classificação é a baseada na transição vítrea das blendas e tempos de relaxações. Considera que além dos casos descritos anteriormente, a situação onde existem estruturas com duas ou mais fases, sendo cada uma delas constituída de uma mistura miscível com concentração distinta e finita de cada componente. Este tipo de mistura é classificado como parcialmente miscível (Camargo, 2003).

É um quarto tipo de estrutura multifásica, em que se observa somente uma transição vítrea, porém, ocorrendo em uma faixa de temperatura mais ampla que aquelas observadas em sistemas de uma única fase. Este comportamento é atribuído à presença de microheterogeneidades, ou seja, à presença de diferentes microambientes com dimensões da ordem de poucos segmentos de cadeia.

As propriedades das blendas são diretamente afetadas pela miscibilidade. A mistura entre macromoléculas resulta em baixa variação de entropia, por isso, para que haja miscibilidade, o fator entálpico deve ser favorecido, ou seja, é necessária a existência de interações específicas tais como: ligações de hidrogênio, interações entre íon-dipolo, dipolo-dipolo ou elétrons π .

Entretanto, estas interações ocorrem em apenas alguns sistemas, de maneira que a maior parte destas blendas é imiscível (Utracki, 1990).

Os tipos de morfologia que geralmente são encontradas em blendas imiscíveis são: (a) dispersão de um polímero em uma matriz polimérica e (b) morfologia de duas fases contínuas.

O tipo de morfologia que será favorecido depende da natureza dos componentes da blenda, e muitas vezes da forma de obtenção. Em misturas mecânicas, a razão de viscosidade dos polímeros na temperatura de processamento e da composição da blenda, assim como cisalhamento e fluxo determinam a morfologia da mistura (Utracki, 1990).

As blendas imiscíveis apresentam uma alta tensão interfacial que, juntamente com a alta viscosidade dos polímeros, dificulta a dispersão de uma fase na outra durante o processo da mistura, favorecendo a coalescência. A baixa estabilidade deste sistema também permite que a coalescência se acentue ao submeter o material a algum processo posterior, como a moldagem, ou mesmo com o tempo de uso.

Outra característica de blendas imiscíveis é a baixa adesão entre as fases. Quando um material é submetido a um esforço mecânico, a transferência de tensão de uma fase para outra ocorre na interface. Se a interação entre as fases for baixa, nesta região ocorrerá um acúmulo de tensões quando o material for solicitado mecanicamente, o que acabará originando uma fratura (Camargo, 2003).

Entretanto, as blendas imiscíveis podem adquirir boas propriedades mecânicas se a interface for modificada pela ação de agentes que sejam capazes de reduzir a tensão interfacial, promoverem a dispersão, aumentar a adesão interfacial e estabilizar a fase dispersa contra a coalescência.

Estes agentes, chamados de compatibilizantes, podem ser adicionados como um terceiro componente ou gerados *in situ*. As blendas que adquirem as propriedades desejadas e resistem à coalescência após a mistura são chamadas de

compatíveis, o que não significa que sejam miscíveis do ponto de vista termodinâmico (Camargo, 2003).

2.8.1 - TERMODINÂMICA E MISCIBILIDADE

A miscibilidade é um fator relevante na preparação de blendas e há uma dependência relevante das variáveis como, temperatura, pressão, massa molar, estrutura molecular, dentre outras. Ela pode ser avaliada, para uma mistura qualquer, pela energia livre molar de mistura de Gibbs (ΔG_m), que está relacionada com a entalpia de mistura (ΔH_m) e com a entropia de mistura (ΔS_m) do sistema (equação 3):

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M \quad (3)$$

Uma definição simplificada de blendas poliméricas, adotada no dia-a-dia, compreende uma mistura de pelo menos dois polímeros, ou copolímeros. Entretanto, quando o fator miscibilidade é importante, define-se:

- a) Blendas poliméricas miscíveis: misturas homogêneas de polímeros, onde a variação de entalpia < 0 favorece a miscibilidade e contribui para uma significativa diminuição da energia livre de Gibbs para a mistura (equação 4):

$$\Delta G_M \cong \Delta H_M \leq 0 \quad (4)$$

O poli (óxido fenileno) e o poliestireno exemplificam este tipo de blenda.

- b) Blendas poliméricas imiscíveis: neste caso a variação de entalpia > 0 não favorece a mistura (equação 5):

$$\Delta G_M \cong \Delta H_M \geq 0 \quad (5)$$

Como exemplo de blenda imiscível temos o acetato de celulose e poliestireno.

2.8.2 - BLENDA POLIMÉRICAS

2.8.2.1 - ASPECTOS GERAIS

O estudo e a obtenção de blendas poliméricas é uma saída para a modificação das propriedades de materiais poliméricos. As blendas de polímeros miscíveis são materiais que podem apresentar propriedades mecânicas melhores que as de cada um dos polímeros componentes isolados.

Entretanto, as blendas com muito baixa miscibilidade apresentam separação de fases, e neste caso, as suas propriedades vão depender das propriedades de cada fase. A primeira blenda patenteada de que se tem conhecimento foi a blenda de borracha natural misturada com guta-percha em 1846.

As blendas obtidas de termoplásticos sintéticos que iniciaram a busca de novos materiais pode ter iniciado com a mistura do poli-cloreto de vinila (PVC), que já era conhecido desde 1872, mas a descoberta da sua plastificação com a borracha estireno butadieno (SBR ou Buna-S) na Inglaterra e Government Rubber-S (GBR) nos USA, foi patenteada em 1933. (Nunes, 1996)

E com a descoberta de um polímero plastificante semi-solúvel, o NBR, tornou-se possível a formulação de uma blenda estável e o efeito do baixo peso molecular do GRS no PVC, criando assim a primeira blenda de um polímero termoplástico e patenteada em 1942, iniciando-se assim uma geração e desenvolvimento de blendas com melhores propriedades de impacto. (Nunes, 1996)

No início da década de 60, os polímeros de engenharia foram explorados como resinas básicas para o desenvolvimento de blendas; estes novos materiais oferecem uma melhoria na resistência mecânica a altas temperaturas, em comparação com as primeiras blendas. (Nunes, 1996)

2.8.2.2 - MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE BLENDS POLIMÉRICAS

Segundo Utracki (1989), há uma variedade de técnicas experimentais que podem ser utilizadas para a preparação e caracterização de blends poliméricas. As técnicas mais usadas na preparação de blends, são as indicadas abaixo. Sendo que os itens a e b são os mais usados:

- a) Dissolução dos polímeros em um solvente apropriado, formando filmes por evaporação do solvente (*Casting*);
- b) Mistura mecânica através da fusão dos polímeros e posterior prensagem.
- c) Polimerização interfacial
- d) Mistura de látex
- e) Outros

A) BLENDS EM SOLUÇÃO:

O método de formação de filmes de blends, por evaporação do solvente (“*casting*”) pode levar à obtenção de filmes densos ou ainda porosos.

Quando uma solução polimérica é espalhada sobre uma superfície plana, e é permitida a evaporação total do solvente, um filme denso e homogêneo se forma. Se a mesma camada de solução é introduzida em um banho de não solvente, um filme poroso é obtido. Este tipo de preparação de filme é denominado “inversão de fases”.

Algumas variações da técnica de inversão de fases são utilizadas na prática. Variações na composição da solução polimérica e do banho de imersão, bem como alterações de temperatura podem levar à formação de filmes com morfologias diferenciadas. Esta versatilidade faz do método de inversão de fases um dos mais utilizados na preparação de membranas porosas (Stropnik e col., 1996 e Ullman´sb, 1986).

Os primeiros polímeros utilizados na fabricação de filmes porosos na forma de membrana foram a celuloses e seus derivados (Camargo, 2003), pela sua

disponibilidade e conhecida capacidade de formar filmes. Atualmente é possível preparar filmes porosos a partir de muitos polímeros, como por exemplo, siliconas, polissulfatos, poliimidadas, dentre outros (Camargo, 2003).

B) MISTURA MECÂNICA:

Esta técnica consiste na mistura de polímeros através da fusão dos mesmos. O principal método de produção destas blendas utiliza extrusoras e misturadores do tipo *Banbury*.

A tecnologia envolvida aqui se baseia na termodinâmica e nas condições reológicas do sistema durante o processo de fusão e mistura. Além disso, a morfologia da blenda, a qual dependerá principalmente do grau de mistura e da taxa de resfriamento, é de extrema importância, pois apresenta influência direta nas propriedades finais do material obtido.

Um exemplo de blenda muito conhecido é: de poliestireno/polietileno de baixa densidade.

C) MISTURA REATIVA:

Este tipo de mistura é conhecido como extrusão reativa, e envolve a introdução de grupos reativos em um polímero, com o intuito de aumentar a miscibilidade dos componentes. As reações químicas mais comumente usadas são aquelas que ocorrem entre ácidos carboxílicos ou anidridos com aminas e grupos epóxi, ou ainda entre aminas e grupos epóxi.

Um exemplo de aplicação desta técnica é encontrado na manufatura de blendas imiscíveis de poli (éter fenileno) e poliamida, com adição de anidrido maleico (Camargo, 2003).

D) MISTURA DE LÁTEX:

Consiste na mistura de dispersões aquosas de dois polímeros ou mais. Em termos de morfologia, o tamanho dos domínios é restrito ao tamanho das partículas de látex.

Um exemplo é a reação entre SAN (estireno-acrilonitrila) e AB (butadieno-acrilonitrila) na formação do copolímero ABS (estireno-butadieno-acrilonitrila).

E) POLIMERIZAÇÃO *IN SITU*:

A polimerização *in situ* envolve soluções ou géis de polímeros em monômeros os quais são subseqüentemente polimerizados. A polimerização *in situ* de estireno, que permite a formação de poliestireno de alto impacto (HIPS), é considerada a mais importante em termos industriais. As redes interpenetrantes (IPN's) também são resultados da polimerização *in situ*. O princípio da formação das IPN's é baseado na combinação de dois polímeros, onde um deles é sintetizado ou reticulado na presença do outro (Camargo, 2003).

2.8.3 - MORFOLOGIA DE BLENDA POLIMÉRICAS:

O grau e o tipo de interação entre dois polímeros são os principais fatores que determinam a morfologia resultante numa blenda. A morfologia de sistemas binários, completamente imiscíveis, pode resultar em um sistema de duas fases, onde uma delas estará dispersa na outra, denominada matriz. Outra possibilidade morfológica consiste em uma rede co-contínua e interpenetrante formada por ambos polímeros.

A influência da temperatura no comportamento termodinâmico da blenda polimérica também é importante, pois ela determina o comportamento de separação de fases e a morfologia. Uma blenda homogênea, quando resfriada ou aquecida, pode ser analisada através de uma curva binodal, onde, ocorre uma separação de

fases de acordo com dois mecanismos distintos: nucleação e crescimento (*nucleation and growth* – NG) ou decomposição *spinodal* (*spinodal decomposition* SD). Tais mecanismos dependem da temperatura final e da localização desta entre as curvas binodal e *spinodal* ou inteiramente dentro da curva *spinodal* (Nunes e Inoue, 1996).

Uma solução inicialmente estável, quando levada a uma condição metaestável, entre as curvas binodal e *spinodal* sofre uma separação de fases pelo mecanismo de nucleação e crescimento (NG). Para iniciar a separação de fases é necessário uma energia de ativação para a formação de pequenos domínios (núcleos). A partir desta etapa, a separação de fase continua com o aumento do diâmetro dos núcleos sem que a sua composição seja alterada.

Neste caso, durante todo o processo de separação a morfologia observada é do tipo matriz domínios dispersos. Nas Figuras 7- 8 são representados os diagramas de fase para um sistema binário e ternário.

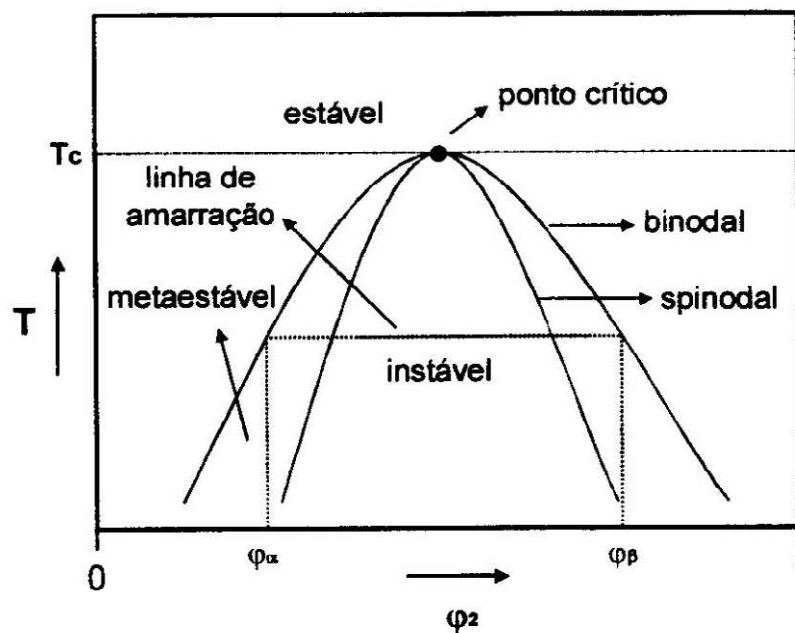


Figura 7 - Diagrama de fases para um sistema binário.

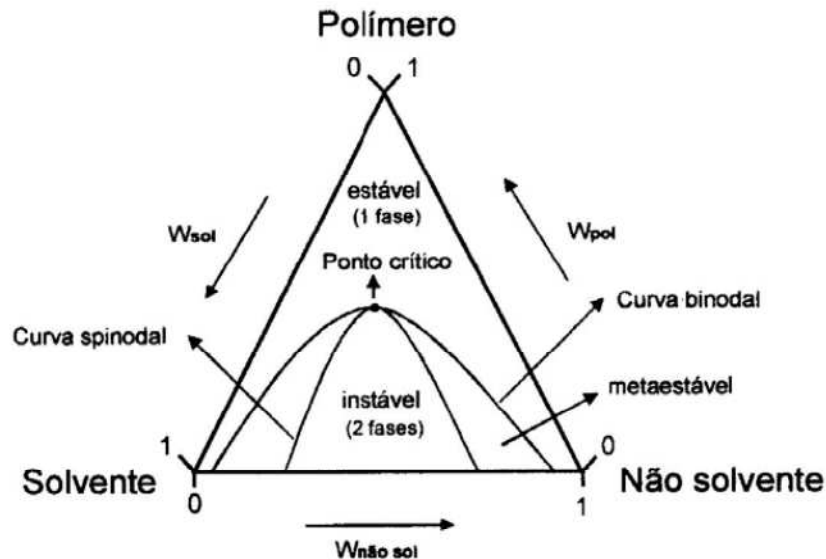


Figura 8 - Diagrama de fases para um sistema ternário demonstrando as curvas binodal e spinodal e o ponto crítico.

Quando a solução da blenda, inicialmente estável é conduzida rapidamente para uma condição instável (abaixo da curva *spinodal*), ocorre a separação de fases pelo mecanismo de decomposição *spinodal* (SD).

Este mecanismo difere daquele de nucleação e crescimento apenas nos primeiros estágios. No mecanismo de NG, a composição dos domínios é constante e somente o tamanho dos núcleos muda com o tempo. Já no mecanismo de SD observam-se três estágios de separação.

Ao analisarmos a solução, no início ocorrem flutuações na amplitude do comprimento de onda com o aumento da concentração. Em um estágio intermediário, tanto a amplitude do comprimento de onda como a concentração vai aumentando com o tempo; a partir deste ponto pode ocorrer a coalescência das fases.

A morfologia observada para o sistema no estágio inicial é de duas fases contínuas e entrelaçadas. Num estágio mais avançado, a morfologia pode evoluir, por coalescência, para o tipo matriz domínios dispersos (Camargo, 2003).

A morfologia obtida para polímeros após um processo de fusão, que pode ser realizada em extrusora ou em misturadores do tipo *Banbury*, depende da tensão interfacial entre as fases, da viscosidade e da elasticidade dos componentes. O componente com viscosidade mais baixa tende a encapsular o componente mais viscoso (ou mais elástico) assumindo assim, a fase contínua.

O tamanho da fase dispersa é governado pela tensão interfacial e pelas características reológicas dos componentes. A forma dispersa pode variar de esferas até fibrilas, dependendo do processamento aplicado.

Freqüentemente existe uma situação intermediária onde uma fase co-contínua ou mesmo uma rede interpenetrante pode ser originada através do controle da composição, da reologia e das condições de processamento.

Portanto, a morfologia obtida durante o processamento é uma estrutura dinâmica que pode estar sujeita a mudanças, originando sistemas que buscam um equilíbrio.

2.8.4 - APLICAÇÕES GERAIS DE BLENDA POLIMÉRICAS A PARTIR DA QUITOSANA

O fator que determina se uma blenda polimérica específica é apropriada para uma dada aplicação é o perfil de necessidade. A necessidade e a especificação de um material são geralmente determinadas por normas padrões (ex.: ASTM, DIN, ABNT) dentro de um segmento industrial. Estas normas padrões são controlados por requisitos obtidos por ensaios ou medições padronizadas e variam em diferentes países e segmentos industriais.

As principais áreas de aplicação para blendas poliméricas são: o mercado automotivo, seguido da indústria de embalagem, eletro-eletrônicos e eletrodomésticos. Os segmentos industriais de menor aplicação são: o mercado de construção civil e a indústria aeroespacial.

2.9 - BLENIDAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM OUTROS POLÍMEROS

2.9.1 - BLENIDAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO /QUITINA E QUITOSANA

Ikejima *et al*,2000, estudaram o comportamento de cristalização e meio de biodegradação em blendas de PHB com quitina e quitosana para a aplicação em filmes de bactérias.

Os filmes foram preparados por meio de solução *casting*, tendo o HFIP como solvente comum. Neste trabalho o PHB, quitina e quitosana foram dissolvidas em HFIP antes da mistura, para evitar que a quitina e a quitosana formem gel através do aquecimento e a degradação térmica.

Neste trabalho, verificou-se que a cristalização do PHB nestas blendas foi suprimida quando a quantidade destes polissacarídeos era aumentada, entretanto a quitosana apresentou maior capacidade de supressão da cristalização do PHB quando comparada com a quitina, conforme a Figura 9

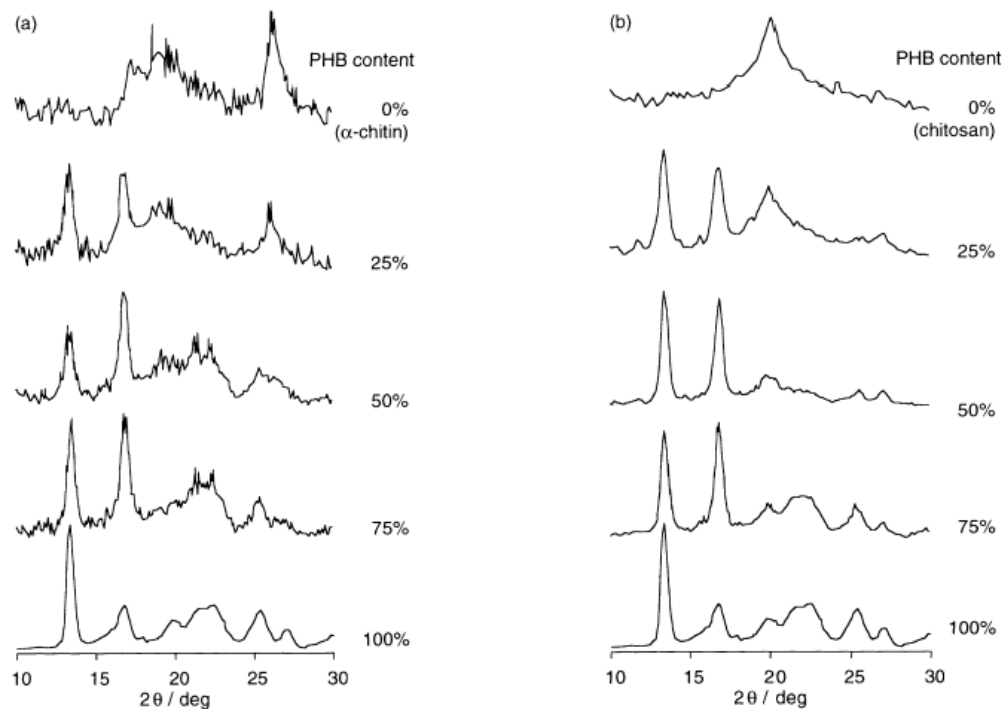


Figura 9 - Difração de raio – x dos filmes de PHB, α -quitina e quitosana, das blendas PHB/ α -quitina e PHB/quitosana: (a) PHB/ α -quitina; (b) PHB/quitosana.

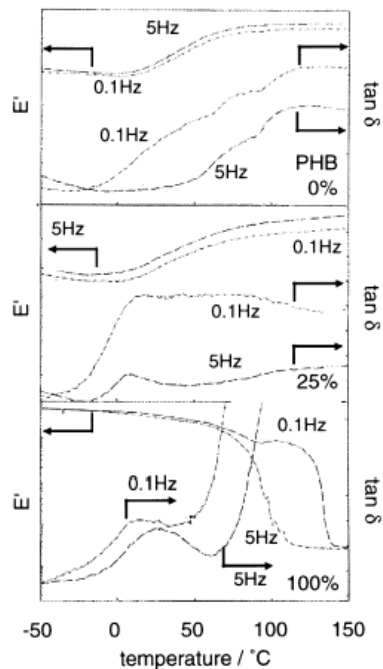
Na Figura 9 estão presentes filmes de quitina, quitosana e blendas contendo 25% de PHB. A figura mostra claramente as difrações que surgem a partir da componente cristalina do PHB, centrada em 13 e 17°.

De acordo com Ikejima e colaboradores, os prováveis fatores que promovem a supressão da temperatura de fusão cristalina (T_m) do PHB na mistura é a diminuição na espessura lamelar dos cristais de PHB e a existência de interações intermoleculares entre PHB e as rígidas moléculas de quitina e quitosana, resultando numa menor flexibilidade da molécula do PHB na mistura e conseqüentemente diminuição da T_m da mistura quando comparada com o PHB puro.

A Figura 10 mostra a viscoelasticidade das blendas de PHB/ α quitina e PHB/quitosana contendo 25 e 50 % de PHB em mesma temperatura, obtida por DMTA. Um método convencional de determinação da T_g usando DSC não pode ser aplicada às blendas de PHB/ α quitina e PHB/quitosana. Os picos de DMTA destas blendas mostram a viscoelasticidade que surge a partir da região amorfa dos componentes das blendas.

O PHB puro exibe uma T_g δ de transição centrada em torno de 15°C, a qual corresponde a T_g do PHB na região amorfa. A temperatura de transição da T_g δ detectada na blenda não pode ser amplamente diferente daquela detectada no PHB puro. A partir deste resultado, o decréscimo na cristalinidade do PHB nas blendas é verificado, podendo ser caudado pela restrição da mobilidade da cadeia do PHB.

As moléculas de quitina e quitosana são rígidas e suas temperaturas de transição são muito elevadas quando comparadas com a do PHB, sendo assim a temperatura de transição na DMTA dos componentes polissacarídeos não podem ser detectadas, devido a dureza dos filmes em altas temperaturas.

(a) PHB/ α -chitin blends

(b) PHB/chitosan blends

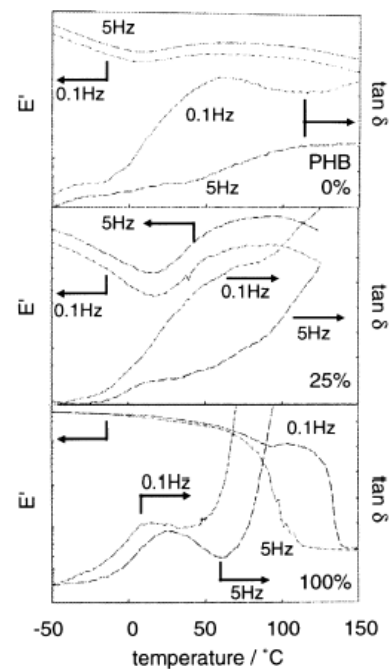


Figura 10 - DMTA do PHB, α - quitina, quitosana e as blendas: (a) PHB/ α - quitina; (b) PHB/quitosana.

2.9.2 - BLENDA DE QUITOSANA COM ÉSTERES DE CELULOSE

As misturas poliméricas, as quais resultam na preparação de novos materiais com melhores propriedades físicas, químicas e mecânicas, faz com que uma devida atenção seja dada para tais misturas poliméricas. As propriedades finais das blendas são determinadas por meio da miscibilidade dos polímeros, a qual favorecida pela formação de pontes de hidrogênio entre os componentes poliméricos. (Chen X. *et al*, 2005).

Chen X., juntamente com seus colaboradores, baseados em estudo já realizados no sentido de analisar a miscibilidade de blendas compostas de quitosana e hidroxipropilcelulose (HPC), estudou e apresentou neste trabalho o resultado obtido com blendas de quitosana (CH) com dois ésteres de celulose, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e metilcelulose (MC). Os estudos foram voltados para a determinação da miscibilidade das blendas formuladas com estes componentes.

Os filmes foram preparados através de solução “*casting*” 0,1M de solução de polímeros em 1% de ácido acético em superfície 2 x 2 x 1 cm de poli(tetrafluoretileno) com posterior secagem em ar a mesma temperatura durante vários dias.

Os difratogramas de alto ângulo das blendas CH/MC presentes na Figura 11, mostram que o filme contendo quitosana pura possui 4 picos de difração ($2\theta = 8.3, 11.28, 18.1, 22.44$), confirmando a presença de domínios cristalinos na estrutura, o que está de acordo com resultados já obtidos por Rihhidj *et al* (2005).

Os difratogramas do HPMC e MC puros revelam que estes são amorfos. Os difratogramas contendo 50% de quitosana mostram picos típicos da quitosana, sendo considerado como uma indicação de imiscibilidade dos polímeros. Para as blendas com 20% de CH o pico é similar a celulose pura, o que indica que esta blenda é mais miscível do que as outras duas. Talvez a miscibilidade desta blenda seja resultado da presença de pontes de hidrogênio via água residual das moléculas.

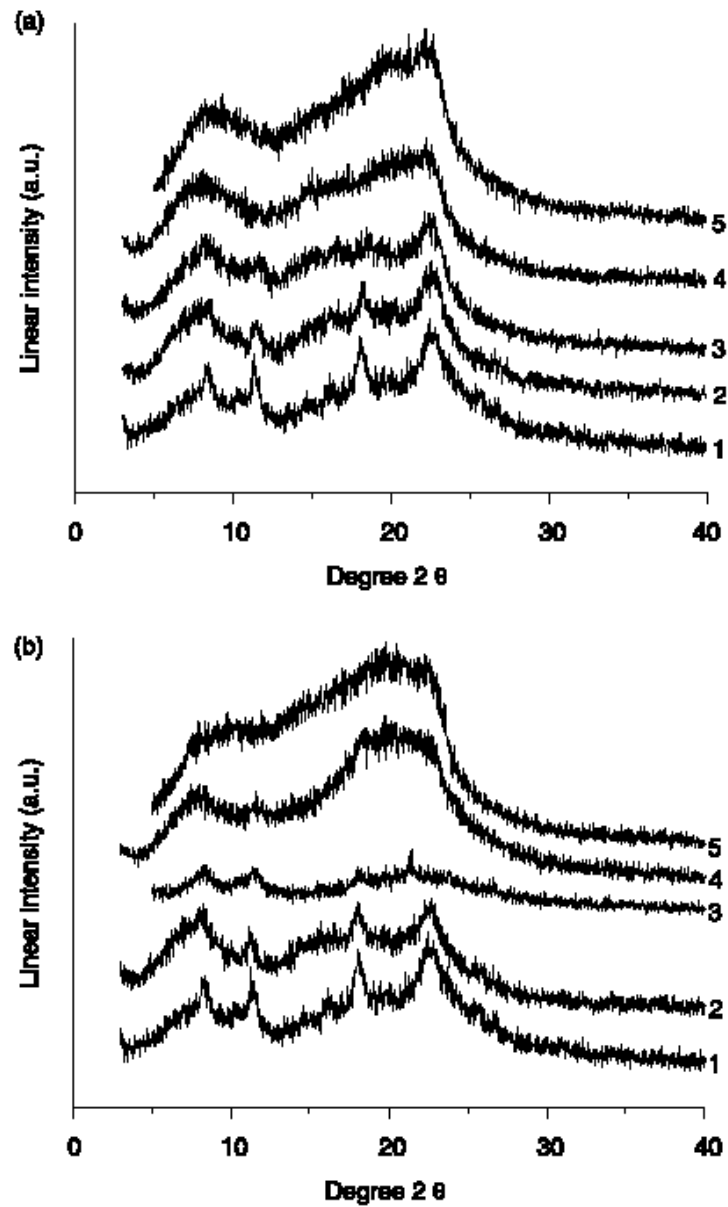


Figura 11 - Difratomogramas de CH/HPMC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of HPMC, (b) difratogramas de CH/MC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of MC.

A verificação de propriedades dos filmes baseados na quitosana e os ésteres de celulose HPMC e MC revelam, que estes não são miscíveis em blendas.

2.9.3 - BLENIDAS DE QUITOSANA COM CELULOSE

Chao e colaboradores formularam blendas de quitosana/celulose usando ácido trifluoracético (TFA) como co-solvente.

A modificação da quitosana por meios físicos como blendas, por exemplo, pode ser conveniente e eficaz para melhorar propriedades físicas para aplicações práticas.

Estudos de blendas de quitosana com macromoléculas sintéticas e naturais são atrativos fortes nos últimos anos.

As blendas de quitosana/celulose são preparadas com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas da quitosana.

Neste trabalho a celulose e a quitosana foram inicialmente dissolvidas em ácido acético (2,0 m%) e ácido trifluoracético (TFA) respectivamente, para a preparação da solução de celulose e quitosana. São feitas blendas de quitosana/celulose em proporções. Através da técnica de evaporação são produzidos filmes com as seguintes composições finais: 3/1, 1/1 e 1/3 (m/m).

Os resultados da análise dinâmicos - mecânica mostra a tensão “*strangth*” dos filmes em função do índice da quitosana. A tensão *strength* da celulose e quitosana são 63 e 34 N respectivamente. A tensão nas blendas fica em torno de 50N, o que revela o predomínio da celulose.

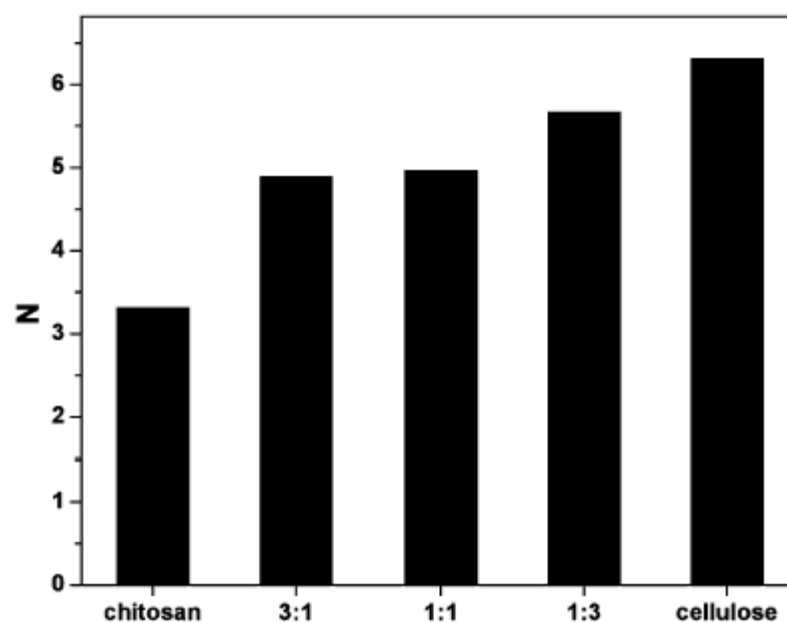


Figura 12 - Tensão “*strangth*” da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

As Figuras 13 e 14 mostram a dependência da temperatura e módulo de armazenamento (E') e (E'') "loss" módulo das blendas de quitosana/celulose e dos polímeros puros. A curva E' e E'' vx temperatura mostra a relaxação característica da celulose, quitosana e blendas. A curva do módulo de armazenamento (E') da quitosana mostra um pico em 0 – 30°, o qual não se vê nas curvas da celulose e blendas. O pico é atribuído a hidratação dos grupos (-CH₂OH) da quitosana. O valor de E' indica que a quitosana pode ser baixo comparado com o a celulose e blendas.

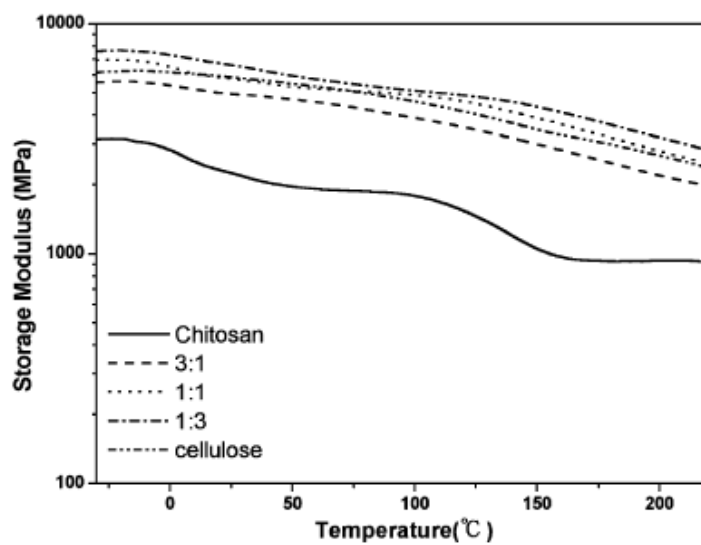


Figura 13 - Módulo de armazenamento (E') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

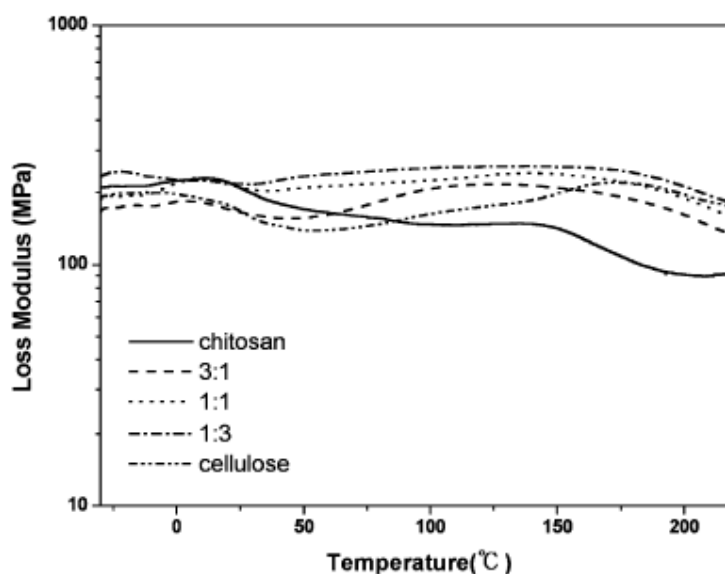


Figura 14 - Módulo "loss" (E'') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

A Figura 15 mostra a dependência da temperatura dos valores da $T_g \delta$ das blendas e polímeros puros.

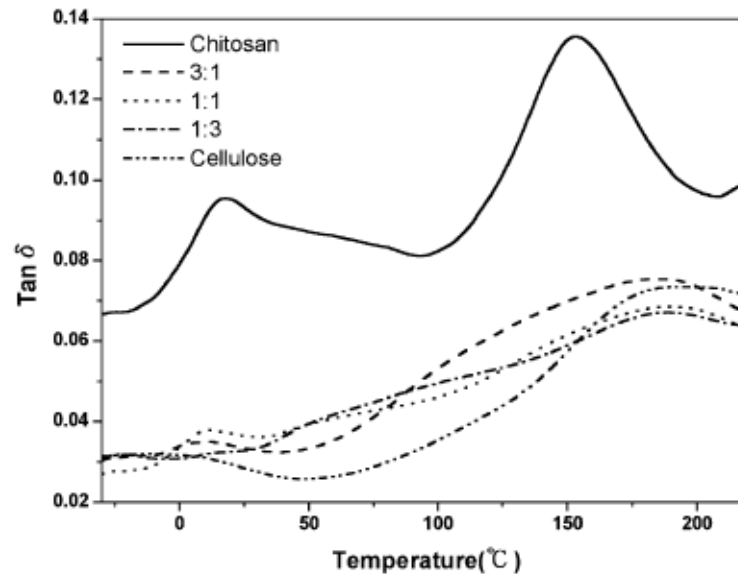


Figura 15 - Dependência da temperatura dos valores da $T_g \delta$ para a celulose, quitosana e quitosana/celulose.

De acordo com o pico da $T_g \delta$ em 190° da celulose, a qual é relatada pelo movimento molecular na região amorfa (Figura 15). A quitosana mostra dois picos em torno de 15 – 22°C e 153°C. O primeiro pico é caracterizado como β relaxação atribuída aos grupos (-CH₂OH) da quitosana. O segundo pico a 153°C é designado como α relaxação refletindo a temperatura de transição vítrea da quitosana.

Estes resultados levam a concluir que as blendas de quitosana/celulose são imiscíveis. As propriedades térmicas, dinâmico – mecânica das blendas mostram que a celulose predomina. O que não é surpresa do ponto de vista cristalino da celulose uma vez que as ligações de hidrogênio intermolecular da celulose são apropriadas para inibir as ligações de hidrogênio nas blendas.

2.10 – MATERIAIS MAGNÉTICOS

Substâncias magnéticas são aquelas que ao serem colocadas sobre a influência de um campo magnético sofrem forças ou torques. Desta forma podemos classificar os materiais pela forma como eles respondem a um campo magnético aplicado, devido à sua susceptibilidade relativa. A susceptibilidade é calculada em relação ao vácuo sendo definida pela razão existente entre magnetização e campo aplicado (equação 6):

$$\chi = M/H \quad (6)$$

Assim podemos classificar os materiais magnéticos em 3 grupos: os diamagnéticos com $\chi < 1$, os paramagnéticos com $\chi > 1$ e os antiferromagnéticos, ferrimagnéticos e ferromagnéticos com $\chi \gg 1$. Materiais diamagnéticos são aqueles que são repelidos pelos ímãs.

O campo magnético gerado pelo ímã faz com que o movimento dos elétrons se altere, como se uma corrente elétrica estivesse passando pelo material, gerando assim outro campo magnético. Esse campo se alinha em direção oposta ao do ímã, causando a repulsão.

Os paramagnéticos são aqueles materiais atraídos pelos ímãs. Eles possuem elétrons desemparelhados que se alinham na direção do campo magnético, diminuindo a energia. Sem a influência do campo, o material mantém os spins de seus elétrons orientados aleatoriamente. Sendo essa a diferença entre os materiais paramagnéticos e ferromagnéticos.

Os materiais ferromagnéticos são aqueles que mantêm sua magnetização à temperatura ambiente quando submetidos a um pequeno campo externo, como é o caso dos elementos do grupo de transição do ferro, como o cobalto, o ferro e o níquel.

Já os materiais antiferromagnéticos e ferromagnéticos tendem a alinhar seus momentos magnéticos na mesma direção, mas em sentidos opostos. Nos antiferromagnéticos os momentos são antiparalelos e de mesma intensidade resultando em uma magnetização nula, enquanto que nos ferromagnéticos apesar dos momentos serem antiparalelos, os momentos vizinhos possuem diferentes intensidades o que resulta em uma magnetização diferente de zero.

Na Figura 16 temos a representação de forma ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais antiferromagnéticos e ferromagnéticos.

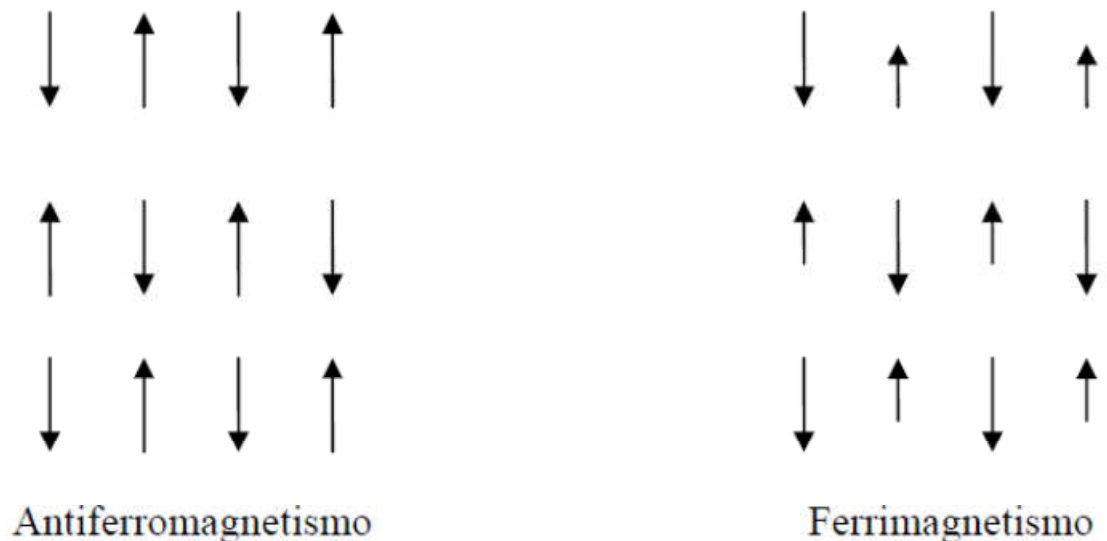


Figura 16 - Representação ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais anti - e ferromagnéticos.

2.10.1 - CURVAS DE MAGNETIZAÇÃO

Um material ferromagnético virgem (desmagnetizado) possui seus domínios magnéticos distribuídos de tal forma que a magnetização total da amostra torna-se nula, como mostrado na Figura 17a. Quando submetida a um pequeno campo externo ocorrem deslocamento das paredes de domínio para diminuir a energia de Zeeman, causando um aumento na magnetização da amostra devido ao deslocamento reversível das paredes de domínio (Figura 17b).

Entretanto, se o campo aplicado for retirado a amostra volta a ter magnetização nula. Conforme o campo externo vai aumentando as paredes de domínio vão se deslocando e ocorre também a rotação dos domínios perpendiculares ao campo (Figura 17c).

Neste momento se tirarmos o campo externo, a amostra já não vai voltar para a configuração inicial devido às imperfeições do material e apresentará uma magnetização diferente de zero denominada de magnetização remanescente, M_r , que ocorre devido aos deslocamentos irreversíveis dos domínios, que acarretam no

aprisionamento de paredes. Deste modo a amostra estará magnetizada. Este deslocamento das paredes de domínio causado pelo aumento do campo externo irá ocorrer até o momento em que todos os domínios magnéticos estejam com a mesma direção e sentido do campo externo e o material atingirá sua magnetização de saturação (M_s), Figura 17d.

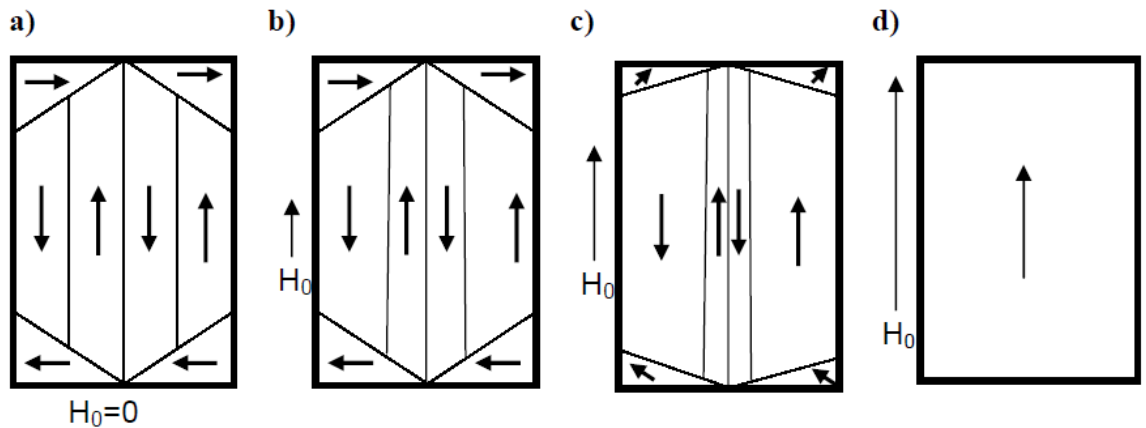


Figura 17 - Esquema ilustrativo da movimentação das paredes de domínio de uma amostra desmagnetizada submetida a um campo externo variável.

Diminuindo o campo aplicado até ficar nulo, encontraremos novamente a M_r . Se continuarmos diminuindo o campo externo, fazendo com que agora o campo esteja no sentido oposto daquele aplicado anteriormente, chegará um ponto onde os domínios magnéticos irão girar deixando a amostra com magnetização nula novamente. Este campo é chamado de campo coercivo (H_c). Fazendo com que o campo aplicado percorra um ciclo completo encontraremos a curva ou ciclo de histerese, como apresentado na Figura 18.

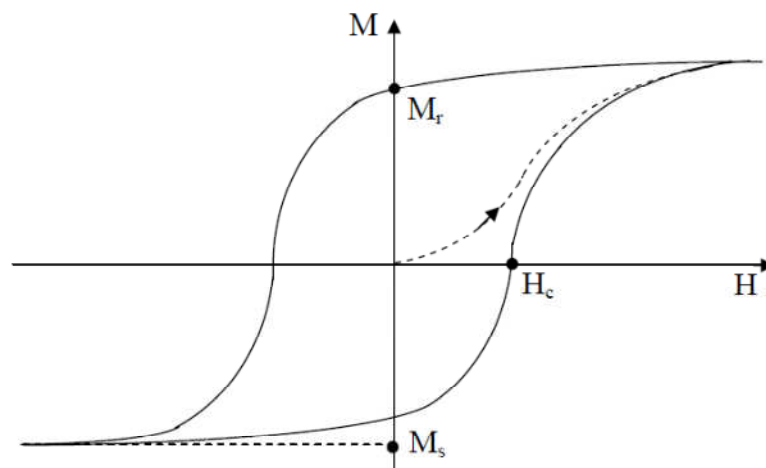


Figura 18 - Representação qualitativa de um ciclo de histerese

2.11 – BIODIESEL

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. Em todo o mundo já se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, que causariam um impacto muito menor no aquecimento do planeta (Gonçalves et. al., 2005). O biodiesel ganhou importância pela sua capacidade de substituir os combustíveis fósseis (Muthu, 2008).

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

O biodiesel é definido como um mono alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais. O seu conteúdo de energia e as propriedades físicas e químicas são semelhantes ao óleo diesel convencional.

Para se produzir o biodiesel, o óleo retirado das plantas ou animais é misturado com etanol (ou metanol) e depois estimulado por um catalisador. Este processo químico é denominado de transesterificação, onde a glicerina é separada da gordura ou do óleo vegetal. O processo gera dois produtos, ésteres (o nome dado ao biodiesel) e glicerina (produto valorizado no mercado de sabões). A Figura 18 mostra o esquema de produção do biodiesel (Furigo et. al., 2009).

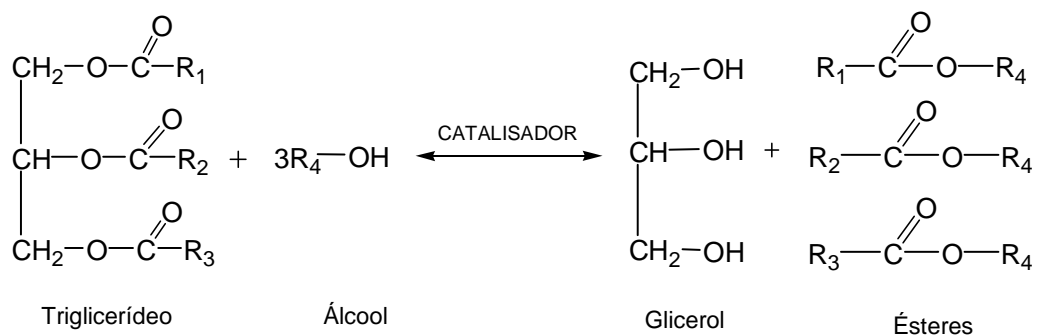


Figura 19 - Esquema resumida da produção de biodiesel.

2.11.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Vários trabalhos têm ilustrado a capacidade das enzimas imobilizadas na produção do biodiesel como catalisador.

Liu e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo onde utilizaram células *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em partículas magnéticas, para a fermentação do etanol em um reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado (MSFBR). O objetivo do trabalho é investigar o desenvolvimento da fermentação do etanol no MSFBR com células imobilizadas em alginato com ferrita.

Para utilizar este sistema (MSFBR) desenvolvido para a produção de etanol a partir de matérias-primas baratas, o melão de cana foi utilizado como substrato com as células imobilizadas no sistema do reator.

O reator estabilizado magneticamente de leito fluidizado (MSFBR) oferece inúmeras vantagens sobre o leito fluidizado convencional, como a eliminação de resíduos sólidos da mistura, baixa variação de pressão através do leito, facilidade de transporte de sólido, bem como a possibilidade de operação de aumento de velocidade de fluidos e até mesmo a operação em contra corrente. E a produtividade do etanol foi maior no MSFBR que em um reator de leito fluido convencional, sem campo magnético.

Chang e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a síntese do biodiesel a partir do óleo de cozinha em um reator, catalisada para lipase imobilizada para substituir parcialmente o diesel do petróleo. A reação de transesterificação foi realizada utilizando uma imobilização barata da lipase absorvida em tecido têxtil, a fim de reduzir os custos do biodiesel.

O estudo mostrou que o óleo de cozinha usado pode ser suficientemente convertido em biodiesel e demonstra uma abordagem eficaz para reduzir o custo da matéria-prima do biodiesel e lipase, e também para reduzir os problemas de poluição.

Iso e seus colaboradores (2001) realizaram um estudo que trata da produção de biodiesel através da reação de transesterificação utilizando lipase imobilizada, que foi realizado através de partículas de caulita porosa como um portador.

Resultados mostram que a lipase *Pseudomonas fluorescens* imobilizada tem maior atividade que a lipase livre.

Keskinler e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a produção de biodiesel 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. Descreve a síntese do copolímero estireno-divinilbenzeno-poliglutaraldeído (STY-DVB-PGA) imobilizado por lipases para produzir biodiesel a partir de óleo de canola. O copolímero sintetizado foi utilizado para imobilizar a enzima, sendo a imobilização realizada por ligação covalente da enzima sobre a superfície interna do microporo hidrofóbico do poli (estireno-divinilbenzeno). A lipase foi totalmente imobilizada com sucesso no copolímero estireno-divinilbenzeno-poliglutaraldeído.

Alves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo sobre o reaproveitamento de lipase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. O comportamento da lipase imobilizada foi estudado após cada batelada de produção de biodiesel. A reação foi realizada tendo como substrato óleo de babaçu e a enzima empregada como catalisador foi a lipase comercial, os experimentos foram conduzidos por um período de 72h, a temperatura ambiente.

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. Os resultados mostraram que a enzima não apresentou grande perda de atividade podendo ser utilizada em diversos ciclos de produção, e o um solvente utilizado na lavagem do suporte entre os ciclos de produção tem influência na atividade da enzima.

Zong e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a transformação de resíduos de óleo para biodiesel por lipase *Penicillium expansum* imobilizada. Sendo que a imobilização da lipase mostrou ser um eficiente biocatalizador para a produção de biodiesel a partir de resíduos de petróleo com alto valor de solvente ácido orgânico. Foi que revelou que a água a partir da esterificação de ácidos graxos livres e metanol proibindo um melhor rendimento de éster de metil. Adsorventes poderia efetivamente controlar a concentração de água no sistema de reação, resultando em um melhor rendimento de éster de metil. Sílica-gel foi provada ser o melhor adsorvente, proporcionando um rendimento de éster de metil de 92,8%

após 7 horas. Além disso, a preparação enzimática exibiu uma maior estabilidade de óleos usados do que óleo de milho, com 68,4% da atividade enzimática original depois de serem reutilizados mantidos por 12 lotes.

Salis e seus colaboradores (2008) realizaram um estudo utilizando oito tipos de lipases comerciais em macro poros de propileno para a síntese de biodiesel que foram caracterizadas (teor de proteína e atividade específica) e imobilizadas em macro poros de propileno através da adsorção. As lipases apresentaram um nível diferente de adaptação ao suporte, conforme determinado pela comparação de sua eficiência catalítica (atividade/carregamento).

A imobilização das lipases foi comparada com a *metanolisis* do óleo vegetal para obter biodiesel em condições livres de solvente. Das oito lipases imobilizadas somente aquelas de espécies *Pseudomonas fluorescens* foram ativas (rendimento do éster=58 mol% após 22 horas), seguido por imobilização da lipase *Pseudomonas cepacia* (rendimento do éster=37 mol% após 51,5 horas), enquanto todas as outras lipases foram inativas na síntese do biodiesel. Sob condições ideais de temperatura, teor de água e carga obteve um rendimento de éster 98 mol% após 70 horas.

Ettayebi e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo tendo como objetivo a produção de etanol a partir do amido por imobilização de *Candida tropicalis*, na presença de α -amilase. *Candida tropicalis* é um organismo potencialmente útil para a produção comercial do etanol, uma vez que é capaz de fermentar em um amido e demonstra que é um sistema atraente para a produção de biocombustível. O presente trabalho demonstrou que o pré-tratamento de amido com α -amilase é suficiente para obter uma completa fermentação por imobilização livre da *Candida tropicalis*.

A produção industrial de bio-etanol por fermentação direta e liquefação do amido, será muito efetiva na redução nos custos da produção do etanol. Isto levou aos autores a sugerir a utilizar este processo de fermentação do amido em repetitivos lotes ou fermentação contínua para um adicional melhora na produção de bio-etanol, sendo que estudos com *Candida tropicalis* expressando α -amilase e celulosas são promissores e conduzirá uma valiosa aplicação na produção do combustível etanol a partir de fontes renováveis e na conversão do milho em etanol.

O uso de enzimas como catalisadores da reação de transesterificação para produção de Biodiesel, tem se tornado uma opção bastante atrativa, devido a especificidade das enzimas e dos benefícios ambientais e econômicos decorrentes

da utilização deste biocombustível. Rampim e seus colaboradores (2006) tiveram como objetivo, realizar o estudo da lipase de *Thermomices lanuginosus* em particular, na catálise de reações que utilizam óleo de soja e etanol como material de partida.

Na Figura 20, pode-se observar a conversão dos TGs (moléculas de triacilglicerídeos) presentes no óleo de soja em produto final da reação de transesterificação, os ésteres etílicos correspondentes.

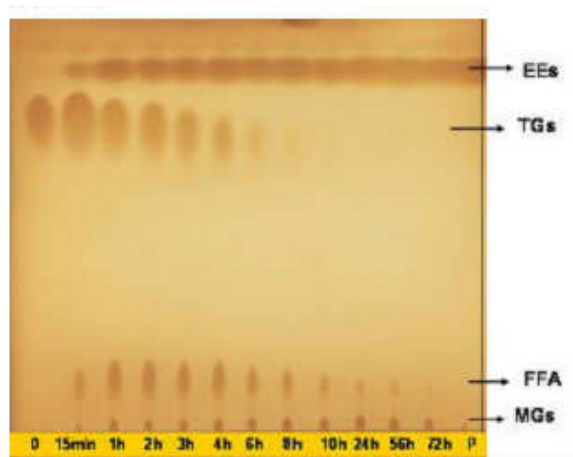


Figura 20 – TLC de 0 a 72horas da mistura reacional da reação de etanolise do óleo de soja para a produção de biodiesel

Na Figura 20, tem-se em 0 óleo de soja e de 15 min. a 72horas pode-se observar o processo da reação. Inicialmente a formação de ácidos graxos livres (FFA) e (mono) glicerídeos (MGs) a partir das moléculas de triacilglicerídeos (TGs) e por último ocorre a conversão destes a ésteres etílicos (EEs).

Tan e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com síntese enzimática de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) a partir da banha imobilizada com *candida sp. 99-125* na produção do biodiesel. O efeito da temperatura, teor de água, quantidade de enzima, solvente e três etapas da metanolisis foram investigados. Tem sido demonstrado que o custo da lipase é grande parte do custo total da produção de biodiesel, e uma das principais vantagens de uma lipase imobilizada é que pode ser repetidamente utilizada durante um período de tempo.

Para investigar a estabilidade da lipase, três etapas da metanolisis foram repetidas a cada 30 horas de cada ciclo, a lipase foi transferida para o mesmo sistema para um novo ciclo. A Figura 21, não evidencia diminuição na atividade da

lipase, que foi observado durante os primeiros 7 ciclos. Rendimentos dos FAMEs foi superior a 80% obtidas durante até o ciclo 7, que mostrou um rendimento de 76,2% e no entanto, o rendimento do ciclo 8 foi apenas de 34,7%.

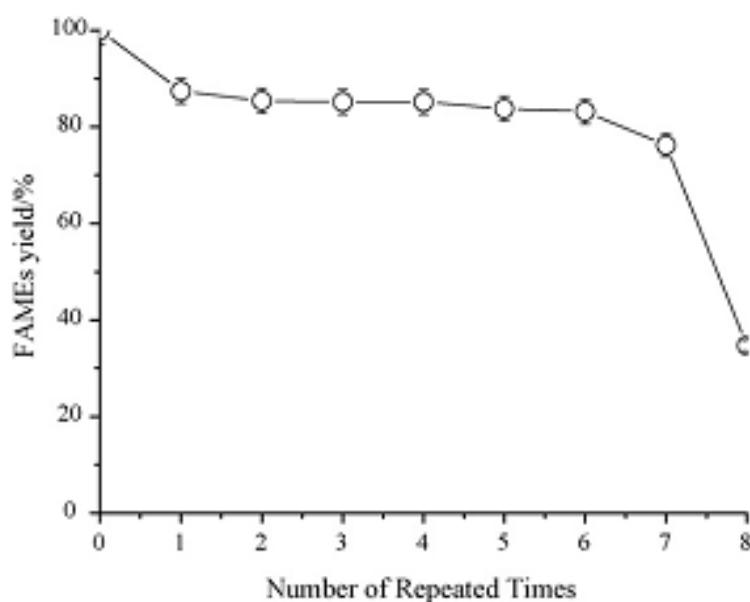


Figura 21 – Estabilidade da lipase imobilizada por repetidos ciclos.

Assim a lipase poderia manter a sua atividade durante pelo menos 180 horas. Estes resultados mostraram que os 3 passos da metanolis com *Candida sp. 99-1t25* imobilizada é eficaz para a produção de biodiesel.

Ettayebi e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com a produção do etanol a partir do amido por imobilização de *Candida tropicalis*, na presença de α -amilase. A *Candida tropicalis* é um organismo potencialmente útil para a produção comercial do etanol a partir da fermentação em um amido, para aumentar a utilização desta fonte de carbono e aumentar a taxa de produção de álcool, nos pré-amido de milho α -amilase, foi utilizada a liquefação do amido que foi suficiente para conduzir a fermentação e para converter 96% de substrato para etanol. Obteve um estudo prévio da viabilidade de produzir etanol a partir da glicose por esta levedura, espécies tanto quanto as células livres ou imobilizadas tanto fenóis e polifenóis em concentrações que são altamente tóxicas para bactérias e outras espécies, demonstrou que é um sistema atraente para a produção de bicomcombustível a partir de recursos renováveis.

Keskinler e seus colaboradores (2009) relatam o estudo da síntese de lipase catalisada por ácidos graxos ésteres de metil (biodiesel) de vários óleos vegetais que usam lipase imobilizada sobre uma matriz polimérica microporosa em diferentes

formas, como um barato biocatalizador. A pesquisa é focalizada em 3 aspectos do processo: (a) síntese, (b) biocatalise de polímeros microporosos e preparação por imobilização da lipase sobre o polímero, e (c) produção do biodiesel. A matriz microporosa do polímero contendo grupo funcional aldeído foi sintetizado pela técnica de poliHIPE que usa estireno, divinilbenzeno, e poliglutaraldeído. A lipase *thermomyces lamuginosus* por ligação covalente é presa sobre o polímero com 80%, 85% e 89% de eficiência na imobilização. A enzima imobilizada foi usada para a produção de biodiesel que usa três óleos diferentes o óleo de girassol, óleo de soja e óleo de cozinha, mostra que a imobilização de enzimas tem atividade durante 10 repetidas reações a 25°C, a cada 24h.

A Figura 22 mostra 3 tipos de óleos diferentes 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%. Este método moderno e simples desenvolvido e efetivo, poderá ter um potencial a ser usado na indústria para a produção de substâncias químicas que requerem enzimas imobilizadas.

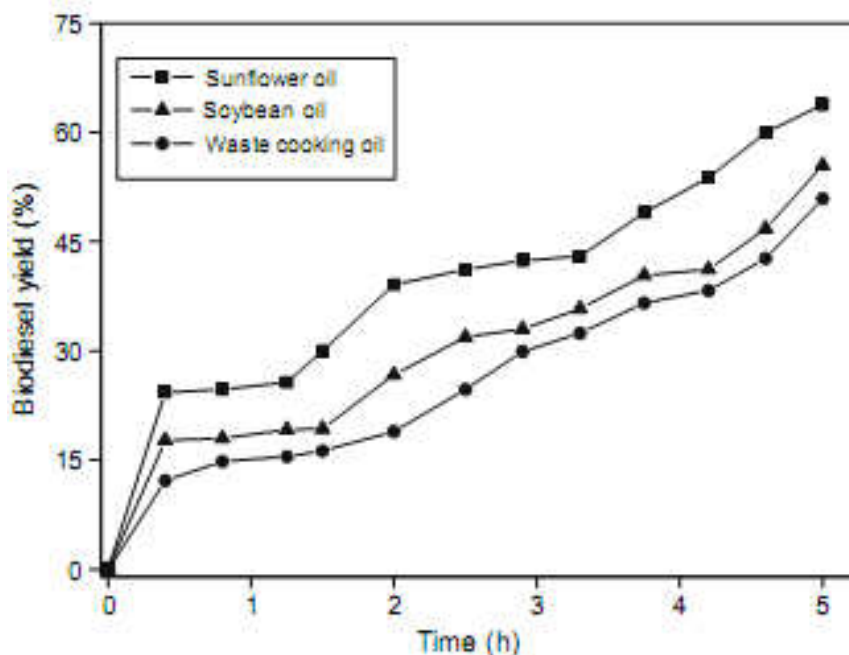


Figura 22 – Variação da eficiência da produção de biodiesel com o tempo para o óleo de girassol, soja e o óleo de cozinha desperdiçado (condições de operação: substrato 21mL/min, temperatura 65°C, reação total 5h)

2.11.2 – PROCESSOS CATALÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL

O termo biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrange os processos em que um catalisador biológico é utilizado para conversão de um substrato em um número limitado de etapas (Oliveira *et. al.*, 2009).

Em geral, o ponto de partida para a escolha de um biocatalisador envolve a especificidade (químio-, régio-, enantiosseletividade) e a velocidade que a transformação é desejada e é efetuada (Oliveira *et. al.*, 2009).

A biocatálise é hoje um dos campos mais promissores dentro de novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microorganismos, de plantas ou células representam os métodos tradicionais de descobertas de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (Carvalho *et. al.*, 2005).

A biocatálise moderna está a desenvolver novas ferramentas e é preciso melhorar uma vasta gama de processos de produção, que reduzem o consumo de energia e matérias-primas e gerar materiais com menos resíduo e produtos secundários tóxicos. Biocatálise é também conseguir novos avanços na área do meio ambiente, de biorremediação enzimática para a síntese das energias renováveis e limpas (Alcalde *et. al.*, 2006).

Atualmente o biodiesel é essencialmente produzido a partir do óleo retirado das plantas e animais por um processo de transesterificação, envolvendo álcool (metanol ou etanol) e um catalisador, homogêneo ou heterogêneo. Quimicamente, o biodiesel é descrito como uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (ésteres mono, di e triglicerídeos). A glicerina, subproduto da reação de transesterificação, pode ser usada na indústria farmacêutica e cosmética (Bordado *et. al.*, 2008).

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. Este

processo pode ser conduzido na presença de catalisadores ácidos, básicos e enzimáticos.

A catálise é o fenômeno em que uma quantidade relativamente pequena de um material estranho à estequiometria – o catalisador – aumenta a velocidade de uma reação química sem ser consumido no processo. A reação catalítica é, pois uma sequência fechada de etapas elementares, análogas à propagação numa reação em cadeia (Guimarães, 2007).

A reação de transesterificação pode ser catalisada por catalisadores homogêneos e heterogêneos. Os catalisadores homogêneos incluem alquis e ácidos. Os catalisadores alcalinos mais usados são hidróxido de sódio, metóxido de sódio e hidróxido de potássio. Ácido sulfúrico e ácido clorídrico são geralmente preferidos como catalisadores ácidos, os catalisadores heterogêneos incluem enzimas.

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 sabonetes que são reações indesejáveis, porque consomem parcialmente o catalisador, diminui o rendimento do biodiesel e complica a separação e purificação (Aracil, *et. al.*, 2004).

Na catálise homogênea, o catalisador e os reagentes estão dispersos na mesma fase, enquanto que na catálise heterogênea, o catalisador constitui uma fase separada. Neste caso a reação química ocorre na interface entre as duas fases, e a velocidade será, em princípio, proporcional à área respectiva. O catalisador é uma macromolécula (enzima), cuja superfície não é uniforme. As reações ocorrem em locais específicos da superfície, os centros ativos (Guimarães, 2007).

A catálise heterogênea tem despertado grande interesse nos setores produtivos e acadêmico-científico. Estes catalisadores apresentam uma série de vantagens bem conhecidas, em relação aos catalisadores homogêneos, como facilidade de isolamento do produto de reação, a possibilidade de obtenção de produtos com alto grau de pureza e de regeneração e reutilização do catalisador, além de não serem corrosivas e dispensarem a etapa de lavagem do produto, o que representa menor geração de resíduos (Soldi *et. al.*, 2007).

Para fazer face às dificuldades encontradas com a utilização dos atuais e convencionais catalisadores homogêneos, nos processos de separação biodiesel/catalisador, começa a ser empregada uma linha alternativa de

catalisadores sólidos, daí designar-se por catálise heterogênea. Por outro lado, estas soluções alternativas e inovadoras de produção de biodiesel permitem rentabilizar economicamente o processo produtivo, tornando-o mais competitivo e também mais sustentável do ponto de vista ambiental.

Neste aspecto, a utilização de sistemas catalíticos heterogêneo para a transesterificação dos triglicerídeos em biodiesel implicará 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 implementado em regime de funcionamento contínuo processual (Bordado *et. al.*, 2008).

A biocatálise se encontra em amplo desenvolvimento atualmente. Pesquisa realizada em vários ramos da química e da biologia tem como principal objetivo desenvolvimento de novos catalisadores para uso industrial. Novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa, foram desenvolvidas a fim de se obter catalisadores com suas especificidades alteradas, bem como a exploração da biodiversidade. Enzimas mais compatíveis com solventes orgânicos e altas temperaturas estão se tornando mais disponíveis, o que certamente levará as indústrias a utilizarem a biocatálise como uma alternativa técnica em comparação com os catalisadores atuais (Conti *et. al.*, 2001).

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento do setor biotecnológico no Brasil, apesar do crescimento econômico brasileiro e as políticas governamentais estarem favoráveis nos últimos anos (o decreto de regulamentação da Lei de Inovação Tecnológica foi assinado pelo presidente Luiz Inácio Lula da Silva no dia 11/10/2005), uma maior interação entre a academia e o setor privado é uma estratégia fundamental para delimitar os problemas que entram o desenvolvimento de programas de treinamento mais específicos de acordo com o interesse industrial dentro das universidades (Oliveira *et. al.*, 2009). Sendo que o Brasil apresenta uma grande vantagem territorial e climática, com uma imensurável biodiversidade ainda pouco explorada.

É importante que a comunidade reflita e lute para promover as interações necessárias, muitas vezes com o laboratório vizinho, vislumbrando o crescimento que pode ser gerado em termos de conhecimento e projetando ainda mais a

visibilidade da Química e outras ciências no âmbito nacional e internacional (Soldi *et. al.*, 2007).

2.12 – BIOCATALISADORES

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídos de proteínas ou glicoproteínas, que participam de muitas reações químicas nos seres vivos. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas catalisam as reações em condições muito brandas, geralmente em soluções aquosas neutras, a temperatura e pressão ambientes. As enzimas também se caracterizam pela especificidade em relação ao substrato, algumas atuando num limitado grupo de compostos, enquanto outras agindo quase que exclusivamente sobre um único substrato (Trevisan, 1993).

As enzimas são usadas há muito tempo, mesmo antes de serem conhecidas, e seu uso estendeu-se gradualmente à produção de bebidas, alimentos, têxteis e medicina. O desenvolvimento da bioquímica, a elucidação dos mecanismos de reação e o desenvolvimento de novas fontes de enzimas diversificaram as suas aplicações (Trevisan, 1993).

As características mais marcantes das enzimas são o seu poder catalítico e sua especificidade. As enzimas têm um enorme poder catalítico. Elas aceleram reações, multiplicando suas velocidades por fatores de, pelo menos, um milhão. De fato, a maioria das reações em sistemas biológicos não ocorre com velocidades perceptíveis na ausência de enzimas (Comerlato, 1995).

2.13 – IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS

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 solúveis 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 comparada 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)

2.14 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (Nascimento *et. al.*, 2004).

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 (Nascimento *et. al.*, 2004).

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (Nascimento *et. al.*, 2004).

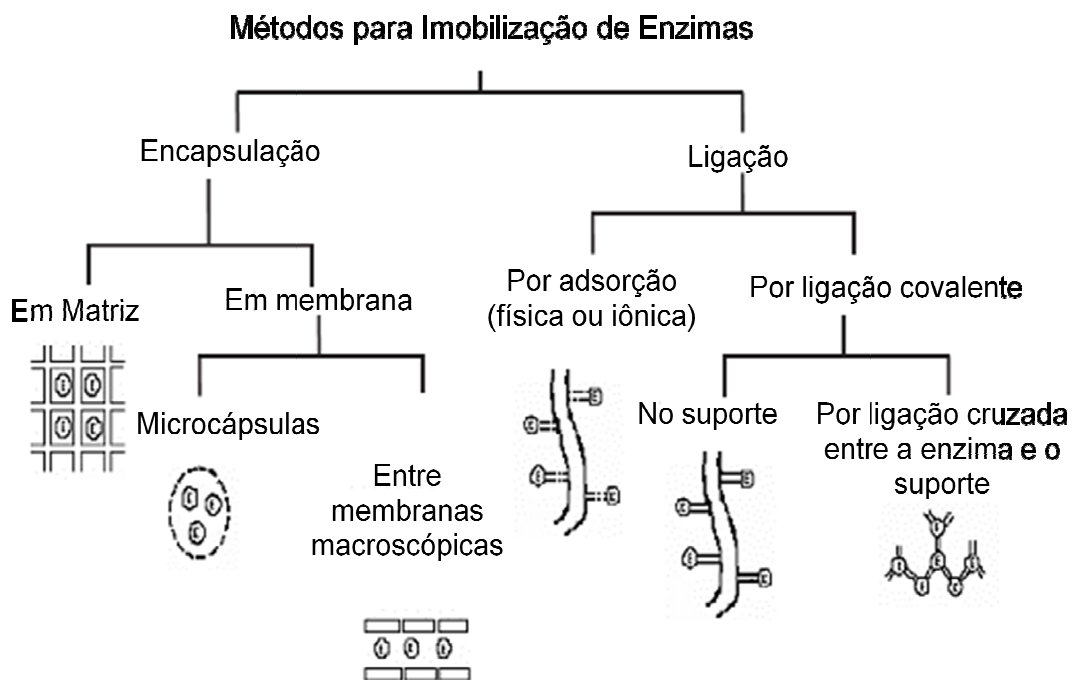


Figura 23 – Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento *et al.*, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento através de uma membrana polimérica. A Figura 23 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Nascimento *et. al.*, 2004).

- LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE

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 (Figura 24).

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 com 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 matam a atividade catalítica das enzimas (Comerlato, 1995).

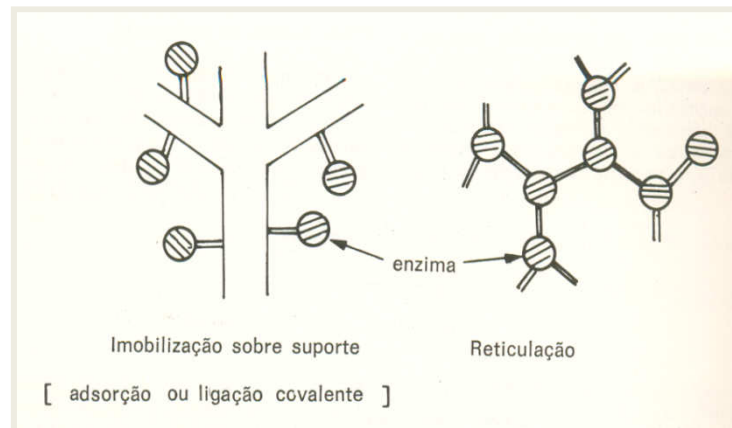


Figura 24 – Imobilização de enzimas sobre suporte.

- LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou suporte inerte. 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 as variações de pH, força iônica, solventes e temperatura (Comerlato, 1995).

- ADSORÇÃO

Este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo (Figura 25). Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima se comparando aos outros tipos de imobilização e, por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica.

A adsorção depende do pH da solução enzimática, obtendo-se valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, no valor de pH correspondente ao

ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada. A adsorção de enzimas em superfícies pode induzir a algumas alterações conformacionais na molécula da enzima devido a interações entre a enzima e o suporte. Suportes hidrofóbicos conseguem adsorver maiores quantidades de enzima e a densidade da camada de adsorção também pode ser maior, relativamente aos suportes hidrofílicos.

Estes resultados indicam que as interações entre a enzima e o suporte são bastante fortes nos suportes hidrofóbicos, o que pode causar, em alguns casos, maiores alterações conformacionais na enzima. Quando se utiliza suportes menos hidrofóbicos, a retenção da atividade aumenta, mas a quantidade de proteína adsorvida diminui e as interações entre a enzima e o suporte serão menores. Este tipo de imobilização pode também ser considerado como uma etapa de purificação da enzima, uma vez que a proteína pode ser seletivamente adsorvida sobre o suporte (Machado *et. al.* 2008).

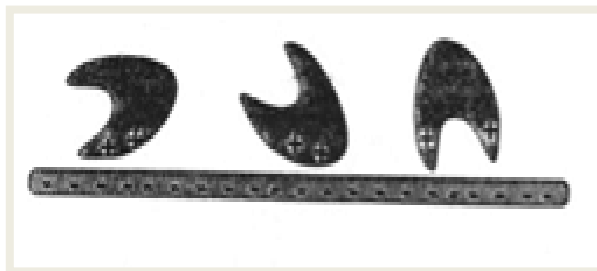


Figura 25 – Método de imobilização de enzima por adsorção em um suporte inerte .

Para melhorar a biocompatibilidade da superfície de suporte para a imobilização de enzimas, Xu e seus colaboradores (2007) criaram um microambiente específico para as enzimas e, assim, beneficiaram a atividade da enzima. Neste trabalho, uma macromolécula natural, a quitosana, foi presa em uma superfície de poli (acrilonitrila-co-ácido maléico) (PANCMMA) para preparar um suporte de camada dupla para a imobilização de enzimas.

Este apoio foi utilizado para a imobilização da enzima por adsorção física. A quitosana tem sido utilizada com sucesso como suporte para imobilização de enzimas e contém uma grande quantidade de proteína, grupos aminoácidos que atuam como grupos de afinidade. A Figura 26 mostra um esquema para a preparação de apoio e de imobilização de enzimas por adsorção. Conclui-se que o

suporte de camada dupla é um suporte potencial na tecnologia de imobilização de enzimas.

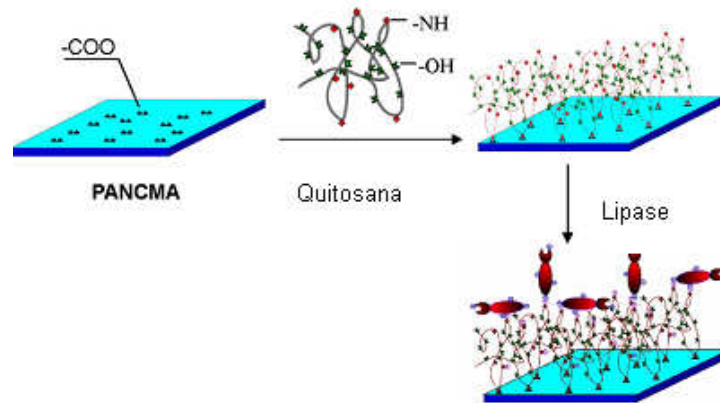


Figura 26 – Representação esquemática da preparação do apoio e imobilização da lipase por adsorção (Xu et. al, 2007).

Besteti e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo desenvolvendo partículas poliméricas para imobilização de enzimas, através da técnica de adsorção física. Os suportes empregados devem apresentar características químicas e morfológicas adequadas para a interação com a proteína. Os polímeros obtidos apresentam caráter poroso, gerando parâmetros de imobilização superiores a de um suporte comercial.

Os materiais poliméricos desenvolvidos foram usados para a imobilização da lipase B de cândida Antártica. O desempenho dessas partículas foi comparado com um suporte disponível comercialmente, Accurel MP 1000, que é à base do pilpropileno. O suporte produzido foi com o núcleo de poli (estireno) e casca de poli (metacrilato de metila), sendo que exibem características morfológicas similares às de um suporte comercial. Os parâmetros de imobilização, para a maioria dos materiais, foram superiores ao do suporte comercial usado com base de comparação.

- CONFINAMENTO EM MATRIZ OU EM CÁPSULAS

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula (Figura 27). A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste

sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos se difundem (Nascimento *et. al.*, 2004).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (Nascimento *et. al.*, 2004).

Microencapsulamento de enzimas tem demonstrado ser uma técnica de sucesso de imobilização. As microcápsulas podem ser facilmente separadas do meio reacional por filtração, e as enzimas imobilizadas têm um potencial de serem utilizadas em vários lotes (Neau *et. al.*, 2002).



Figura 27 – Imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento.

Neau e seus colaboradores (2002) realizaram um estudo com objetivo de imobilizar a lipase de *candida rugosa* utilizando diferentes polímeros para avaliar o carregamento de enzimas, atividade e caracterização. Agarose, alginato e quitosana foram selecionados para imobilizar a lipase, sendo usada a técnica de microencapsulamento.

As esferas de agarose exibiram indesejáveis inchaços, atividade média e o polímero não foi utilizado, esferas de alginato e de quitosana foram preparados por gelatificação iônica. A lipase pode ser imobilizada com sucesso pelo confinamento em esferas de alginato e de gel de quitosana, a eficiência do confinamento por esferas de alginato ou de quitosana não foi alterada pela diferença do tipo de polímero. A eficiência do confinamento foi de 44-50% em ambos os tipos, mas a atividade enzimática é menor no alginato. A maior atividade de enzimas em esferas de quitosana comparadas às esferas de alginato pode ser atribuída a interação do alginato com a enzima.

Nas esferas secas-congeladas também não a atividade da lipase contendo esferas de alginato e quitosana. A Figura 28 mostra a atividade significativa da esfera de quitosana a 2,0%(m/v).

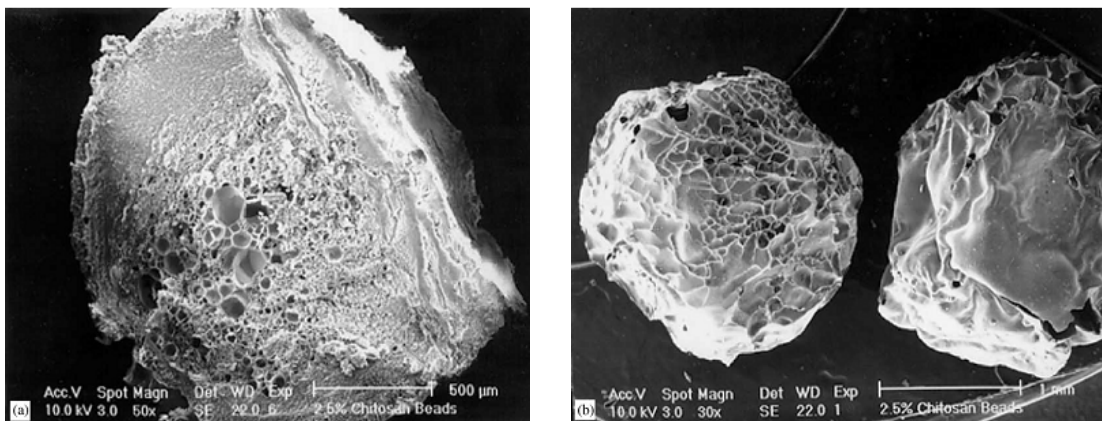


Figura 28 – Microscopia eletrônica (a) corte transversal (b) superfície, esferas de quitosana a 2,0%(m/v).

As técnicas de confinamento e encapsulamento sobre polímeros naturais são cada vez mais conhecidas, devido a seu baixo custo, processo de reutilização, ausência de toxicidade e bom para o meio ambiente. Encapsulamento de enzima é o confinamento físico das enzimas dentro de uma membrana polimérica pela fase de transição do soluto (polímero) contendo a enzima (Ravindra *et al.*, 2009).

Ravindra e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo com uma nova abordagem para a imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* encapsulada em k-carragenina. Nenhuma tentativa foi feita para encapsular enzima em k-carragenina formando cápsulas com o núcleo líquido. O encapsulamento da lipase em k-carragenina foi realizado através de co-extrusão, as cápsulas da lipase eram de forma esférica com diâmetro na faixa de 1,3-1,8mm e uma espessura de 200µm

(figura 29). Na foto da lipase, encapsulada pode ser observado o núcleo interno da solução da lipase e o exterior do núcleo k-carragenina.

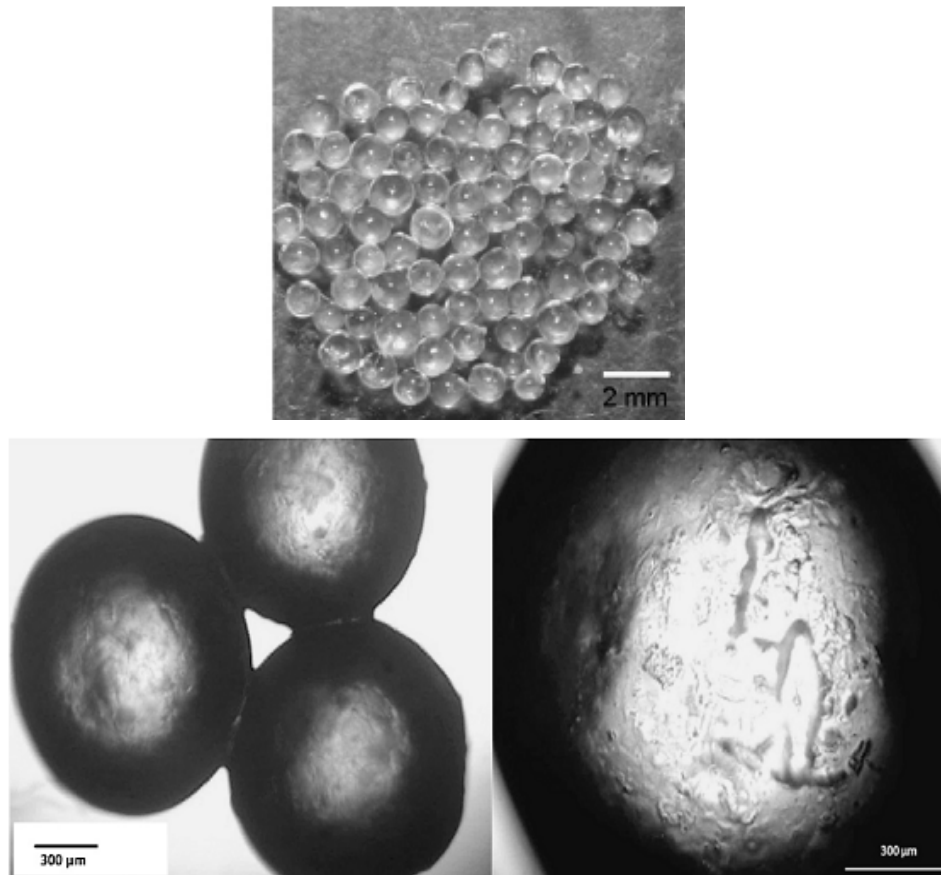


Figura 29 – Fotos da microscopia da lipase encapsulada com o núcleo líquido no meio rodeado por uma matriz de k-carragenina.

O encapsulamento da lipase mostrou bom pH, temperatura e armazenamento de estabilidade semelhante à lipase livre e conserva 72,3% de sua atividade original após utilizada para 6 ciclos. Pode ser armazenada por 10 dias em temperatura ambiente sem mudar sua atividade.

Rilling e seus colaboradores (1997) realizaram um estudo onde citocromo C foi utilizado como um modelo composto para estudar o comportamento das proteínas durante o processo de encapsulamento de microcápsulas de alginato e a perda por difusão durante o armazenamento. Esferas de gel de alginato foram revestidas com multicamadas de membrana constituídas por camadas alternadas de poli (N-vinilamina), poli (ácido acrílico) ou carboximetil celulose. Na prática da

imobilização de enzima duas dificuldades existem: durante a formação de esferas, normalmente ocorre uma sensível perda de enzima; e, durante a aplicação, algumas enzimas são perdidas por difusão na solução. Por este motivo se usa citocromo C para quantificar estes efeitos.

Utilizando a técnica de multicamadas, é possível produzir multicamadas com membranas de ajustável permeabilidade. Se as enzimas são imobilizadas com alginado, obtém-se melhores imobilização e rendimentos quando a concentração de sais na solução de gelificação é mantida tão baixo possível.

2.15– POLÍMEROS NATURAIS UTILIZADOS COMO SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Polímeros naturais têm sido utilizados para imobilização de enzimas em vários estudos (Murat, 1995). Polissacarídeos representam o grupo mais utilizado entre eles, por contribuir para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um micro-ambiente favorável e mantendo dessa forma, a atividade enzimática (Nascimento *et al.*, 2007).

Lee e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo modificando esferas de quitosana com diversos aminoácidos e selecionaram para a melhor atividade de imobilização a lipase, sendo preparada pela ativação da espinha dorsal da quitosana. Portanto, esferas de quitosana com propriedades diferentes poderiam ser facilmente preparadas por introdução de aminoácidos na sua espinha dorsal, considerando que os aminoácidos são materiais adequados para a preparação de esferas de quitosana modificada com o aumento da compatibilidade da lipase.

O processo de preparação é simples e econômico, e alguns aminoácidos são esperados para melhorar o desempenho catalítico da lipase imobilizada. A Figura 30 ilustra o esquema e modificação das esferas de quitosana com diversos aminoácidos

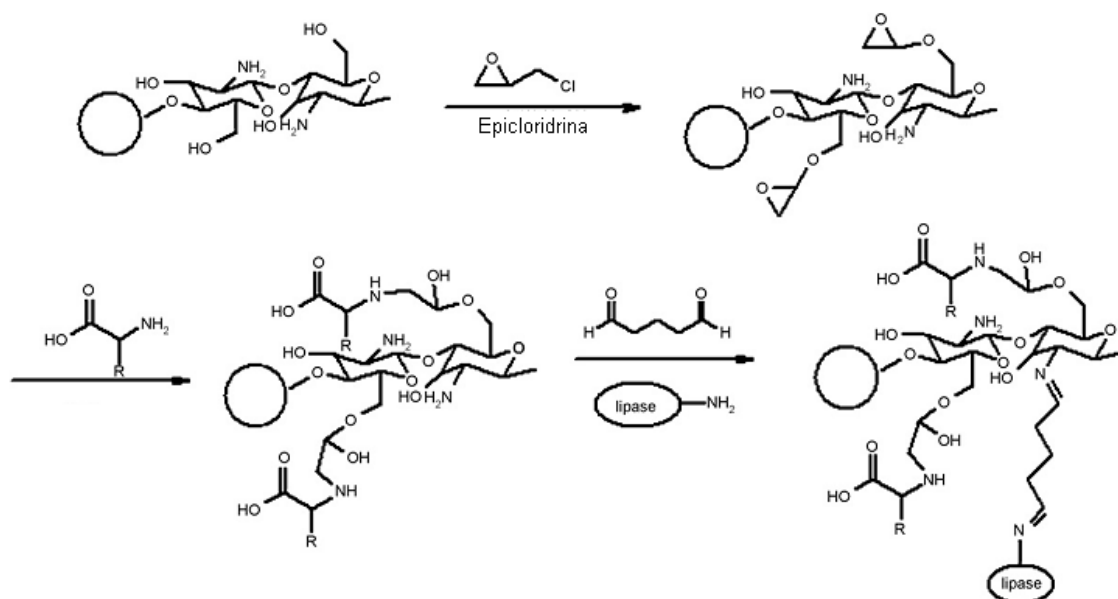


Figura 30 – Ilustração esquemática da preparação de aminoácidos modificando esferas de quitosana e imobilização de enzimas .

Huang e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo com microcápsulas 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. 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 podem ser muito melhoradas. A Figura 31 mostra a reação do grupo aldeído, próximo à superfície das esferas, interagindo com o grupo amino da enzima.

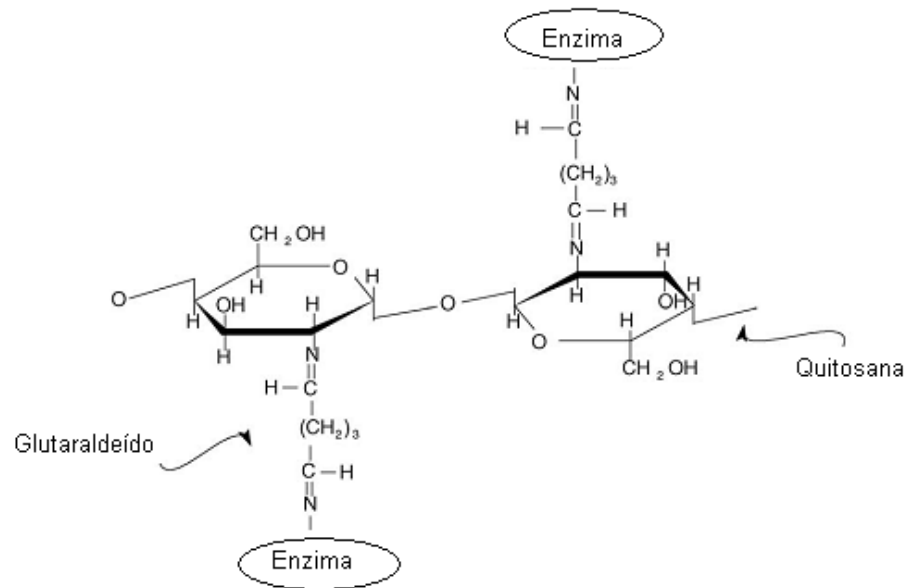


Figura 31 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microcápsulas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído.

A Figura 32 mostra a microscopia eletrônica de varredura do polímero natural quitosana e microcápsulas magnéticas de quitosana, sendo que as microcápsulas 82% tinham partículas de tamanhos de $3\mu\text{m}$ à $6.2\mu\text{m}$ 18% estavam na faixa de $6.2\mu\text{m}$ à $8.4\mu\text{m}$. No entanto a enzima imobilizada apresentou propriedades de estabilidade que melhoraram notavelmente.

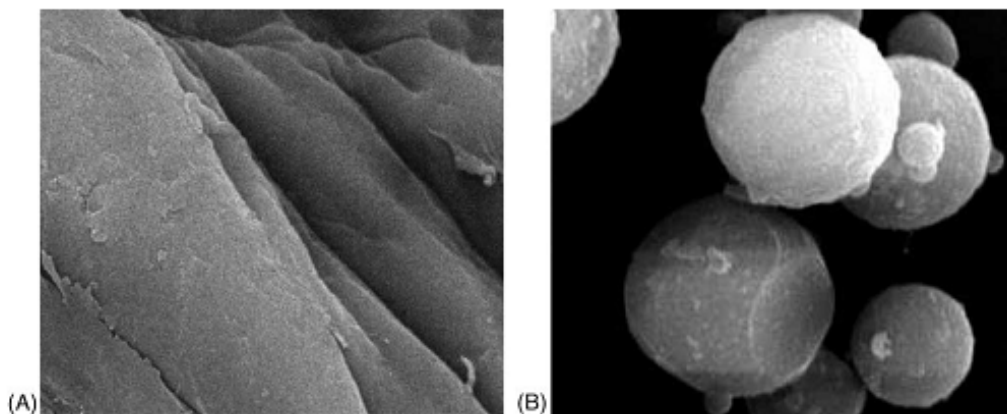


Figura 32 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microcápsulas magnéticas da quitosana (Huang et. al., 2005).

Gonçalves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo 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.

Cruz e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo imobilizando lipase de *Candida antarctica B* em esferas de quitosana para a produção de biodiesel por transesterificação de óleo de mamona. Tais enzimas vêm sendo intensamente investigadas na transesterificação de óleos e gorduras para a produção de biodiesel. No entanto, a aplicação das lipases, como de quaisquer enzimas na forma livre, torna-se inviável devido o fato de perderem atividade. Desta forma, para aumentar a vida útil das enzimas, as mesmas podem ser imobilizadas em suportes sólidos e dentre os vários suportes sólidos é possível destacar a quitosana.

O objetivo específico deste estudo era caracterizar e otimizar as condições de imobilização da lipase de *Candida Antarctica B* em esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído e promover os mesmos experimentos de caracterização para a lipase imobilizada comercialmente. Através do estudo da imobilização da lipase CALB L, constatou-se que a imobilização ocorreu de forma mais eficiente quando a solução enzimática foi incubada com esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 3% (v/v).

Wu e seus colaboradores atuaram na imobilização da lipase (2003) em esferas de quitosana utilizando amonioácidos e seus grupos hidroxila, através da imobilização binária. Por uma escolha adequada do processo de imobilização, os custos operacionais de processos industriais envolvendo lipases podem ser significativamente reduzidos. Através deste método de imobilização binária, a estabilidade térmica e a reutilização da lipase aumentaram consideravelmente.

Foresti e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo utilizando as lipases *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida antarctica B* imobilizadas em quitosana em pó previamente tratada com solução aquosa de glutaraldeído com diferentes concentrações. A quitosana utilizada para este fim cumpre o requisito de ser um material de apoio, além de ser reconhecida pelas suas

excelentes propriedades para imobilização de enzimas, tais como, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

A imobilização foi confirmada em microscopia e as atividades das nove lipases imobilizadas foram testadas. O estudo permite selecionar entre os catalisadores dois materiais que combinam alta atividade e seletividade: CA/CHIT e PF/CHIT/GLU 0,025. A Figura 33 mostra as microfotografias (a) quitosana em pó, (b) PF/CHIT/GLU 0,025, (c) CA/CHIT/GLU 0.025 e (d) CA/CHIT. A foto de (b) mostra um escasso aglomerado da lipase de cândida *Antarctica B*, já em (c) e (d) são claramente visíveis.

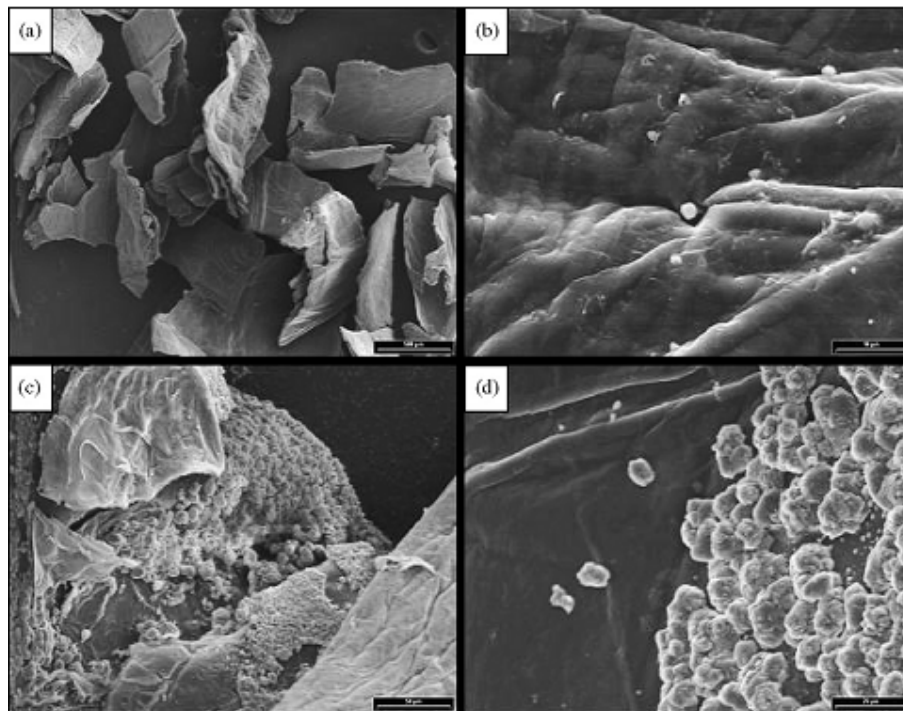


Figura 33 – Microscopia eletrônica quitosana em pó (40 x), (b) FP / QUIT / GLU 0,025 (x 2000), (c) CA / Chit / GLU 0,025 (400 x), e (d) CA / Chit (1000 x) (Foresti et. al., 2007).

Amiji e seus colaboradores (2004) realizaram um estudo preparando microcápsulas de alginato-quitosana a fim de desenvolver uma matriz biocompatível para a imobilização de enzimas. O entrecruzamento do núcleo de alginato foi uniformemente revestido com uma camada de quitosana. Este estudo ilustra um novo método de imobilização enzimática para aplicações biotecnológicas utilizando núcleos líquidos ou sólidos revestidos com uma microcápsula. A enzima é localizada e protegida no núcleo da matriz, enquanto a casca pode regular entrada e saída de substrato e produto.

A figura 34 mostra a micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana, pode ser visto que a mesma possui uma grande porosidade no núcleo.

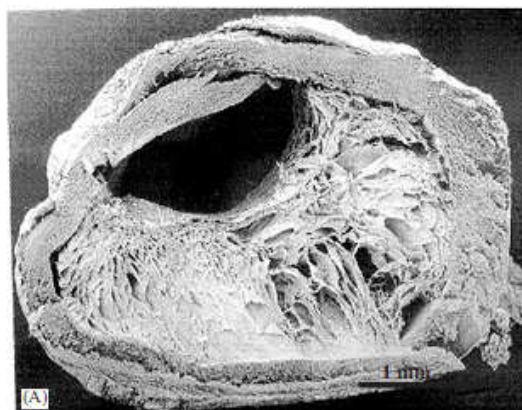


Figura 34 – Micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana .

Murat (1995) realizou um estudo no qual a urease foi encapsulada em esferas xantana-alginato (XA), seguido por glutaraldeído (GA). As esferas retidas apresentaram alta atividade enzimática (75%), juntamente com boa estabilidade operacional, mesmo após 20 utilizações repetidas, e, assim, as esferas de GAXA podem ser utilizadas com sucesso em urease encapsulada por várias razões: encapsulamento com urease apresenta maior atividade enzimática através de pH e temperatura, quando comparado a sua forma livre; a esfera de GAXA pode ser facilmente preparada em polímeros naturais com baixo custo.

Xu e seus colaboradores (2005) realizaram um trabalho onde uma macromolécula natural, quitosana, foi entrelaçada à superfície de uma membrana de poli (acrilonitrila-co-ácido meleico) (PANCMA) para fabricar uma membrana de dupla camada de apoio a imobilização da enzima, já que a quitosana é considerada um apoio adequado para a imobilização. A lipase *Candida rugosa* foi imobilizada sobre esta dupla camada de membrana utilizando glutaraldeído (GA), sendo que o suporte utilizado para a imobilização da enzima é importante uma vez que sua interação com a enzima pode influenciar na estabilidade.

Wu e seus colaboradores (2003) realizaram um estudo onde criaram um novo conceito de imobilização de enzimas, tendo como suporte a quitosana contendo dois grupos hidroxilas ativados com carbodiimida para aumentar a quantidade de carregamento de enzima. O método de imobilização da lipase *Candida rugosa* a dois tipos de esferas de quitosana foi realizado ativando-se os grupos hidroxilas da quitosana com agente de acoplamento.

Minteer e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre o efeito do grau de diacetilação sobre enzimas imobilizadas em quitosana modificada através da sua hidrofiliçidade. A quitosana é um polissacarídeo diacetilado formado da quitina que, ao longo da última década, tem sido empregada na modificação da hidrofiliçidade para induzir uma estrutura micelar. Estes polímeros micelares foram utilizados com várias finalidades, sendo uma a imobilização de enzimas. O estudo avalia o efeito que o grau de diacetilação tem sobre a modificação hidrofóbica e o peso molecular médio da quitosana e as conseqüentes alterações da atividade enzimática após a imobilização da glicose oxidase na estrutura micelar.

O trabalho demonstrou que as características físicas e as propriedades químicas da quitosana com a hidrofiliçidade modificada dependem do grau de diacetilação da quitosana.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

- Quitosana fornecida pela Sigma Aldrich, Brasil, com grau de desacetilação em torno de 80% e massa molar média igual a 161g/mol segundo o fabricante.
- Hidróxido de sódio (NaOH), fornecido pela VETEC.
- Tripolifosfato de pentasódio (TPF), VETEC fornecido pelo LCQUI/UENF.
- Polióxido etileno (PEO) de massa molar média igual a 1×10^5 g/mol, fornecido pela Sigma Aldrich.
- Copolímeros em bloco, poli(etileno-co-óxido de etileno), com 50 e 80% de PEO.
- Permanganato de potássio, fornecido pela VETEC
- Todos os solventes empregados são de grau PA.

3.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA

A modificação física de um polímero é comumente feita através da mistura física de dois ou mais polímeros, sem que haja ligação química entre eles. As blendas poliméricas são um tipo de mistura física sem ligação química.

A formulação de blendas poliméricas é muito interessante devido ao efeito cooperativo decorrente da mistura que resulta em melhoria das propriedades, em relação aos constituintes separados. Existem diversos processos de obtenção de blendas poliméricas, como citado na seção 2.9. Neste trabalho foi utilizado a técnica por evaporação do solvente (*casting*) .

3.2.1 – OBTENÇÃO DAS BLENDA POLIMÉRICAS

O método de formulação de blendas utilizado foi o de evaporação do solvente que consiste em espalhar a solução polimérica sobre uma superfície plana e então é permitida a evaporação total do solvente, um filme denso e homogêneo se forma.

3.2.1.1 - PREPARAÇÃO DA QUITOSANA

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas a partir da dissolução do material em solução aquosa de ácido acético a 1,0% (v/v). As soluções de quitosana foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após a dissolução do material, as soluções foram filtradas em placa de vidro sinterizado com tamanho de poro G1 (Merse), para a eliminação das impurezas insolúveis da quitosana. As soluções filtradas foram então desaeradas sob pressão reduzida.

Os filmes de quitosana com PEO, PE-b-80%-PEO, PE-b-50%-PEO e PE-b-PEO-COOH, foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e polímeros em relação (QUITOSANA/ Polímero) de 80/20. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

A silanização das placas utilizadas como moldes foi efetuada utilizando-se óleo de silicone aplicado com papel absorvente, de modo a recobrir uniformemente a superfície interna das placas, que foram então mantidas em estufa por duas horas a 200°C. As placas foram cuidadosamente lavadas com uma esponja macia umedecida com água e detergente (comercial) e imersas em água corrente por dois minutos. Após este procedimento, as placas permaneceram imersas em água destilada por 12 horas, sendo secas à temperatura ambiente antes de seu uso.

As soluções de quitosana ou quitosana/polímero foram vertidas nas placas de Petri, estas foram mantidas em dessecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M

por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

As membranas produzidas foram secas à temperatura ambiente sob prensagem entre duas folhas de papel de filtro, sendo, então, envoltas em papel vegetal e armazenadas à temperatura ambiente.

3.2.2 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLIÓXIDO ETLILENO

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas de acordo com metodologia citada anteriormente.

Os filmes de quitosana com PEO foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e PEO em relação (Q/ PEO) de 80/20. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

As soluções de quitosana ou quitosana/polímero foram vertidas nas placas de Petri silanizadas e, estas foram mantidas em dissecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

3.2.3 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLI(ETILENO - *co* - ÓXIDO ETILENO) E POLI(ETILENO - *co* - ÓXIDO ETILENO) MODIFICADO.

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas de acordo com metodologia citada anteriormente.

Os filmes de quitosana com PE-b-80%PEO, PE-b-50%PEO e PE-b-80%PEO-COOH previamente obtido por oxidação em meio básico do PE-b-80%PEO (Fontineles, 2006) foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e PE-b-80%PEO e PE-b-50%PEO em relação (Q/ Copolímero) de 80/20 m/m. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

As soluções de quitosana ou quitosana/copolímero foram vertidas nas placas de Petri previamente silanizadas e, estas foram mantidas em dissecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

3.3 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E BLENDAS

3.3.1 - CARACTERIZAÇÃO POR FTIV

Uma molécula pode absorver energia proveniente de radiação eletromagnética, sofrendo vários tipos de excitação como eletrônica, rotacional, mudança de *spin* e deformação de ligação, entre outras. A espectroscopia no infravermelho refere-se à radiação de excitação a números de onda entre 4000 e 600 cm^{-1} . A diferença de intensidade entre o feixe de referência e a do feixe transmitido mede a quantidade de radiação absorvida. Os números de onda de absorção relativos aos modos de vibração dependem da força da ligação química entre dois átomos, e a intensidade de absorção da diferença do momento dipolar nesta mesma ligação. Desta forma, é possível caracterizar a função química a qual pertence o composto.

A matéria é capaz de interagir com a energia proveniente da radiação eletromagnética, sofrendo vários tipos de excitação como eletrônica, rotacional, mudança de *spin* e deformação de ligação, entre outros.

A espectroscopia no infravermelho investiga a interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com a matéria. O FTIV será realizado no equipamento VARIAN 3100 FT-IR SCALIBUR SÉRIES disponível na Unidade de Caracterização Térmica do Instituto de Macromoléculas Eloisa Mano do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As amostras analisadas estão sob a forma de filmes. Os espectros serão obtidos em um intervalo de 4500 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4.0 cm^{-1} e 20 acumulações por espectro.

3.3.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O microscópio de força atômica permite ao usuário superar a limitação que a microscopia de tunelamento impõe em relação a amostras não condutoras. Também é possível analisar amostras em ambientes úmidos. Uma ponta de prova é posicionada em uma haste de material macio, que varre a amostra analisada. Um feixe laser incide sobre a parte posterior da haste e, após sofrer reflexão, é defletido em um fotodiodo com dois setores.

A diferença de intensidade da luz que alcança os dois setores é uma medida da deflexão do suporte e fornece um sinal que é enviado ao circuito eletrônico. A deflexão é então mantida constante durante a varredura. A varredura é feita com força constante entre a amostra e o suporte. A medida da força de arraste da ponta de prova sobre o substrato pode ser associada, por exemplo, com a força de adesão de células ao substrato. A aproximação da ponta à superfície analisada é menos delicada já que a ponta é suportada por um material macio e evitará dano à amostra (DESCOUTS *et al*, 1995).

As imagens foram obtidas em um AFM Multimode Nanoscope III scanning probe microscope Veeco Instruments, em atmosfera ambiente e temperatura controlada (21°C), usando modo contato intermitente. Será usada uma resolução de 256x256 linhas e scanner AS-12 ("E") de área de varredura de 10 x 10 µm e faixa vertical de 2,5 µm. Foram usados cantilever de fósforo dopado com silício de frequência de ressonância de 235-295 KHz, constante de mola de 20 a 80 N/m.

O modo contato intermitente permite obter imagens de superfícies mais irregulares como o caso da maioria dos materiais poliméricos o que não é permitido com o modo contato em que há uma aproximação muito grande entre sonda e amostra. Neste modo de análise a frequência de varredura será inferior a 1 Hz para garantir um bom sinal, capaz de gerar uma imagem superficial adequada do material analisado.

A rugosidade dos filmes foram medidas a partir das análises de AFM, a determinação da rugosidade de superfícies tem sido feita através das análises de microscopia de força atômica quando operado em modo de contato intermitente. As diferenças relativas à morfologia da superfície dos filmes foi avaliada através de três parâmetros de rugosidade. Esses foram, à diferença entre o ponto mais alto e mais

baixo para uma dada área, simbolizada pela letra z ; o desvio padrão do valor de z (R_q) para a área superficial analisada; e a rugosidade média (R_a) que representa o valor médio das alturas da superfície, relativas a um plano central que divide a mesma em duas porções de igual volume.

Na Figura 35a temos de forma ilustrativa o modo de varredura da ponta pela superfície, na Figura 35b a imagem gerada da superfície de uma amostra, além de um quadrado com comprimento lateral L , que representa a área que esta sendo analisada e na Figura 35c o perfil da linha destacada na Figura II.5b.

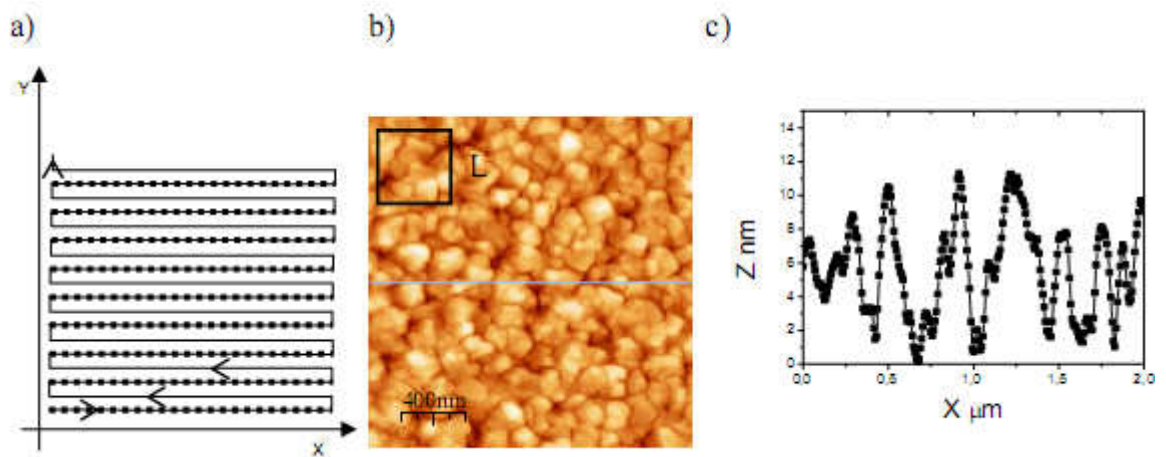


Figura 35- Esquema ilustrativo do modo de varredura do AFM para a obtenção dos parâmetros de rugosidade

O desvio padrão (R_q) é determinado através da Equação 8.

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum (z_i - z_m)^2}{N_p}} \quad (8)$$

Onde z_i é a altura no ponto i , N_p o número de pontos, z_m é a média das alturas. A rugosidade média (R_a) é determinada através da Equação 9.

$$R_a = \frac{1}{L_x L_y} \int_0^L \int_0^L |f(x, y)| dx dy \quad (9)$$

Onde $f(x, y)$ é o perfil superficial relativo ao plano central, e L_x e L_y são as dimensões da superfície nas direções x e y , respectivamente (Khayet *et al.*, 2004).

As medidas de rugosidade foram feitas pelo programa de computador NanoScope (R) III, fornecido pela fabricante do AFM utilizado nas análises. A área da superfície dos filmes avaliados foi de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, sem tratamento prévio da imagem.

3.3.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

Nessa técnica, um feixe colimado de elétrons varre a superfície da amostra. Os elétrons espalhados são coletados, gerando um sinal que é amplificado e usado para modular o brilho de um tubo de raios catódicos que é varrido simultaneamente ao feixe de elétrons. A imagem gerada é uma imagem ponto a ponto. Como a profundidade de campo é muito grande, essa técnica é muito utilizada em estudos topográficos.

Vários tipos de contrastes podem ser utilizados de acordo com a finalidade da análise. Na análise com contraste por elétrons secundários, são captados elétrons com baixa energia, oriundos da superfície da amostra. Essa particularidade permite a análise de detalhes retro espalhados, são coletados elétrons de maior energia, oriundos de uma profundidade maior da amostra. Esse contraste é fortemente dependente das espécies atômicas envolvidas. Isso faz com que essa técnica seja potencialmente usada na identificação de fases que não apresentam significantes diferenças morfológicas.

3.3.4- ANÁLISE DE PERMEABILIDADE POR GRAVIMETRIA

Sorção e difusão de gases e vapores orgânicos em polímeros têm grande importância tecnológica. Uma análise cuidadosa das propriedades de transporte pode tornar mais claros aspectos estruturais dos polímeros, sendo estes influenciados pela natureza do polímero, morfologia, natureza e densidade de ligações cruzadas, cristalinidade, tamanho da molécula do permeante, temperatura de preparação de amostras, entre outros fatores (Poley e *colab.*, 2005).

Em resumo, a permeabilidade pode ser definida como a quantidade de permeante atravessando um filme polimérico de espessura unitária, por unidade de área, por unidade de tempo e a uma determinada pressão de vapor. Sua unidade comumente encontrada na literatura é o Barrer: 10^{-10} [cm^3 (STP) $\text{cm cm}^{-2} \text{s cm Hg}^{-1}$] (Galego e *colab.*, 2002).

No caso de experimentos de permeação, um gás é introduzido em um dos lados da membrana a pressão constante. Considerando a magnitude das pressões, supõe-se que a pressão do outro lado da membrana é zero.

O equipamento utilizado é o *Halogen Moisture Analyzer* modelo *HR73* da *Mettler Toledo*. Este equipamento baseia-se na medida da perda de massa do solvente permeado através da membrana.

São utilizados para o experimento os seguintes materiais: anel de teflon, anel de borracha, lacre de alumínio e um frasco de vidro pequeno específico. O anel de teflon não permite o contato entre a membrana (filme polimérico) e o lacre de alumínio. O anel de borracha é colocado entre a membrana e o frasco, auxiliando o lacre de alumínio na vedação do sistema. (Figura 36)

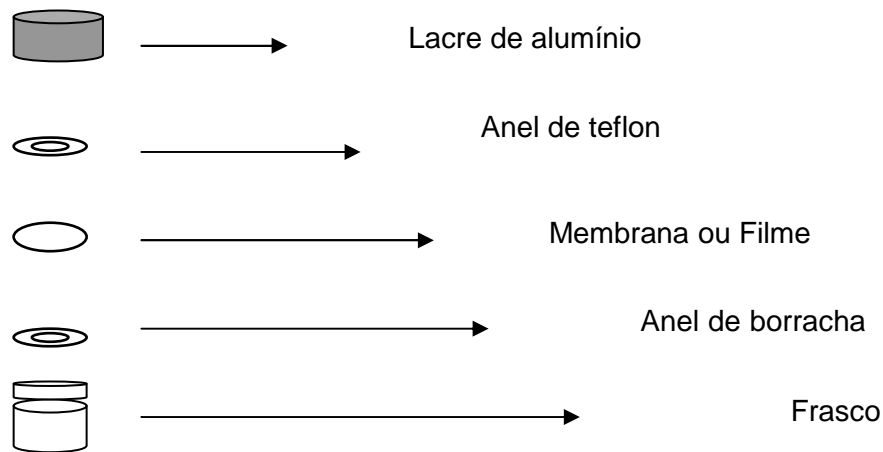


Figura 36 - Sistema tipo “copo de Payne” utilizado para medidas de transporte de massa.

A permeabilidade depende de um termo cinético relativo à difusão das moléculas através do filme e outro termodinâmico, relacionado ao calor de adsorção que influi na solubilidade das moléculas do permeante no polímero

A solubilidade depende da absorção das moléculas do permeante pelo polímero. A absorção aumenta com o aumento da interação entre o polímero e o permeante.

Os experimentos foram realizados utilizando-se água a uma temperatura de ensaio de 50°C, 55°C e 60°C. O coeficiente de permeabilidade foi determinado pela Equação (10).

$$\frac{Ql}{P_V A} = TDH \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad (10)$$

A equação foi adequadamente adaptada para trabalhar com vapor de água. Neste cálculo, deve-se considerar também a temperatura do ambiente, além da temperatura na qual a balança estabiliza o sistema (já considerada), e a umidade relativa do ambiente.

$$P = \frac{Ql}{A(R_1 - R_2)P_V} \quad (11)$$

Onde:

Q – coeficiente angular do ajuste linear do gráfico de permeabilidade;

L – espessura da membrana;

A – área da membrana;

R₁ – umidade no interior do sistema (copo de Payne);

R₂ – umidade no ambiente externo ao sistema;

P_v – pressão de vapor da água na temperatura do ambiente.

Uma informação importante que se pode obter através do coeficiente de permeabilidade é a energia de ativação, que pode ser obtida através do gráfico de log(P) versus 1/T, no gráfico a energia de ativação pode ser obtida a partir do coeficiente angular da reta de ajuste linear. (Poley, 2005)

3.3.5 - CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA

O grau de miscibilidade da região amorfa das blendas formuladas será avaliado através do comportamento termo-mecânico através da técnica de análise dinâmico-mecânica (DMA). A análise de DMA mede de forma separada o comportamento mecânico sob o efeito de tempo e temperatura da fase cristalina e amorfa do polímero (Lucas *et al*, 2001). Este ensaio permite a determinação da temperatura de relaxação da transição vítrea do polímero devido à análise em separado das modificações microscópicas da fase amorfa.

As propriedades dinâmico-mecânicas de materiais são definidas a partir do comportamento do material frente a deformação ou à aplicação de tensão oscilatória de pequena amplitude. Normalmente submete-se o material à uma deformação senoidal. Se o comportamento visco elástico é linear, material responderá à deformação com uma tensão também senoidal, porém defasada de um ângulo δ em relação à deformação devido à dissipação de energia.

Das misturas obtidas, a caracterização do grau de miscibilidade pela fase amorfa, será realizada através de corpos de prova retangulares com dimensões de 22,5 x 8,2 x 0,21 mm ($\pm 10\%$). A mesma análise será realizada também com os filmes de 100%CH. As análises serão realizadas em um TA Instruments DMA 2980 multi-freqüência, com *clamp* tipo garra, freqüência de 1 Hz, taxa de aquecimento de 4°C/min, na faixa de temperatura de -90 a 100°C, utilizando nitrogênio como gás de resfriamento na unidade de caracterização térmica e de superfícies do SEPOL/LAMAV/UENF

3.3.6 – CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Desde que os raios X são de natureza eletromagnética, eles devem ser difratados em planos cristalinos se a distância entre os planos for comparável ao comprimento de onda dos raios X. Em cristais, os quais possuem ordem tridimensional, o arranjo dos planos na rede faz com que a difração ocorra. Os raios emitidos de diferentes planos cristalinos interagem sistematicamente entre si, fornecendo reflexões discretas. De acordo com Bragg, a posição da reflexão é dada pelo comprimento de onda λ do feixe de raios X incidente, pela distância d entre os planos paralelos e pelo ângulo θ entre o raio incidente e o plano da rede ou seja:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (12)$$

em que n é a ordem da reflexão. Em polímeros, a reflexão de maior intensidade é comumente encontrada para $n = 1$. Se os planos dos diferentes cristalitos são aleatoriamente distribuídos uns em relação os outros (como em pós-cristalitos), então o raio monocromático encontrará partículas suficiente para produzir todas as posições de reflexões que preenchem as condições de Bragg. Desde que haja

muitos cristalites pequenos com diferentes orientações de planos cristalinos, será obtido em sistema de cones coaxiais de raios X com um vértice no centro da amostra. Uma seção vertical deste sistema de cones sobre um plano fotográfico fornece uma série de currículos concêntricos, ou setores de currículo, no caso de um filma cilíndrico.

Polímeros amorfos expostos aos raios X apresentam sobre uma placa fotográfica anéis fracos sobre um *background* forte e difuso. Esses máximos fracos também denominados de halos são originários de uma “ordem” local em polímeros amorfos. Polímeros parcialmente cristalinos também mostram estes halos, mas, em adição mostram em anéis fortes de reflexões cristalinas.

A origem do *background* difuso é devida, principalmente ao espalhamento do ar, com contribuições pequenas do movimento térmico nos cristalites, e ao espalhamento Compton. O espalhamento Compton é um efeito de espalhamento incoerente e quantizado que ocorre igualmente em todas as substâncias independentemente de seu estado físico.

A intensidade das reflexões e dos halos geralmente é interpretada de acordo com um modelo de duas fases, como por exemplo, o conteúdo das fases cristalinas amorfas. Para efetuar essa análise deve-se subtrair a intensidade do *background* difuso

Em análises de raios X, podem-se utilizar vários tipos de detectores sensíveis, como, por exemplo, um contador proporcional. Este sistema detecta e conta os fótons de raios X separados em um feixe difratado. Com este método, registra-se a intensidade versus o ângulo 2θ diretamente.

Cada um dos métodos (fotográfico e difratométrico) tem suas vantagens e desvantagens. A técnica fotográfica registra de uma só vez o padrão inteiro de difração e é excelente para localizar inicialmente máximos de difração, mas é ruim na produção de dados quantitativos, devido a problemas relacionados à leitura fotométrica dos dados. Já o contador difratométrico fornece resultados quantitativo diretamente, mas pode ocorrer perda de pontos de difração, o que permitiria o estabelecimento das condições adequadas para a obtenção do difratograma.

Para o estudo de materiais poliméricos por difração de raio X, há duas regiões de interesse, são elas:

1 – A região dos altos ângulos, que corresponde aos ângulos 2θ de Bragg até 30° - 50° .

2 – A região dos baixos ângulos, que corresponde aos ângulos 2θ de Bragg até 1° .

Os resultados que podemos obter a partir das técnicas de raios X de alto ângulo são:

1 – *Quantidades relativas das fases cristalina e amorfa no polímero*: para determinar o conteúdo amorfo, inicia-se a análise a partir do ângulo mais baixo de espalhamento, uma vez que as reflexões cristalinas são quase ausentes nesta região. Por outro lado, a difração cristalina apresenta normalmente um mínimo (intensidade máxima) entre dois máximos, se estes estiverem separados por mais de 3° . Para a análise, assume-se que a intensidade difratada é proporcional ao conteúdo cristalino e que a intensidade dos halos amorfos é proporcional ao conteúdo amorfo (em um ângulo ou uma faixa de ângulos específicos). Os fatores de proporcionalidade dependem também do ângulo de observação e de uma função específica. Estes podem ser determinados, por exemplo pela comparação com amostras completamente cristalinas ou amorfas. Amostras amorfas podem ser obtidas pelo resfriamento rápido (nem sempre possível) do polímero fundido ou pelo estudo direto por raios X da amostra no estado fundido. A intensidade das reflexões será, então, uma medida da cristalinidade.

2- *Tamanho e perfeição dos cristais*: à medida que os cristais expostos aos raios X se tornam menores ou menos perfeitos, os picos difratados ou as linhas tornam-se mais largos. Infelizmente, em muitos casos, não é possível diferenciar as duas causas de alargamento de linha ou pico em amostras poliméricas, a menos que duas ou mais ordens de reflexão (de planos com índices de Miller (110) e (220), por exemplo) possam ser observadas. Na ausência de ordens múltiplas, é praticamente impossível identificar a origem do alargamento dos picos, a menos que outra informação ajude a tomar a decisão correta. Além disso, os cristais devem estar presentes acima de uma certa concentração mínima, caso contrário, a intensidade da reflexão correspondente não será obtida por este método.

Para obter difrações de raios X discretas, é necessário, ainda que se tenham concentrações suficientemente altas de regiões ordenadas bidimensionais e que estas se estendam por distâncias de, pelo menos, 2 a 3 nm. Este fato torna suspeito o cálculo do tamanho dos cristais a partir a largura das reflexões para macromoléculas. As posições das unidades monoméricas de cadeias individuais são, de fato, levemente deslocadas umas em relações às outras na cristalização por

razões cinéticas, isto é, partes da cadeia são fixadas em estados de ordem antes que toda a cadeia adquira a posição ideal na rede.

Portanto, este efeito provoca variações locais na constante da rede que por sua vez, podem promover o alargamento dos picos.

3 – *Orientação*: quando uma amostra se torna cada vez mais orientada, os anéis de difração dos raios X se transformam em arcos, os quais podem se tornar cada vez mais estreitos e se apresentar na forma de pontos. Como resultado da orientação tanto em filmes como em fibras, temos que o eixo molecular é alinhado paralelamente à direção do estiramento (chamado meridiano) e o equador corresponde à direção perpendicular a ela. O cálculo da orientação cristalina é bastante complexo.

4 – *Ordem de empacotamento*: as reflexões equatoriais em um diagrama fornecem informação a respeito do empacotamento entre as cadeias, da regularidade e da ordem lateral de longo alcance no cristal, além da simetria da célula unitária.

Os filmes obtidos a partir das blendas de quitosana, foram estudados pela técnica de difração de Raios X a partir da deposição do filme no porta amostra utilizando difratômetro marca SHIMADZU modelo XRD 7000 (Figura 37). Os dados de difração foram coletados de 5° a 40° (2θ), sendo utilizados com os seguintes parâmetros de medida de tensão de 40 kV, corrente no filamento de 30mA, foi usada radiação de cobre, com velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$.



Figura 37 - Difratômetro marca Shimadzu modelo XRD 7000, utilizado para as análises.

3.3.7 – CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas fotoacústicas como parte da caracterização das propriedades térmicas das blendas em colaboração com o grupo de pesquisa “Fenômenos Fototérmicos” do Laboratório de Ciências Físicas (LCFIS) da própria Universidade (UENF).

A técnica fotoacústica pertence a uma família de técnicas fundamentadas no chamado efeito fototérmico. Este efeito consiste na medida da flutuação da temperatura de um meio devido a absorção de energia radiante modulada. A variação de temperatura da amostra é detectada indiretamente por meio de um microfone de eletreto.

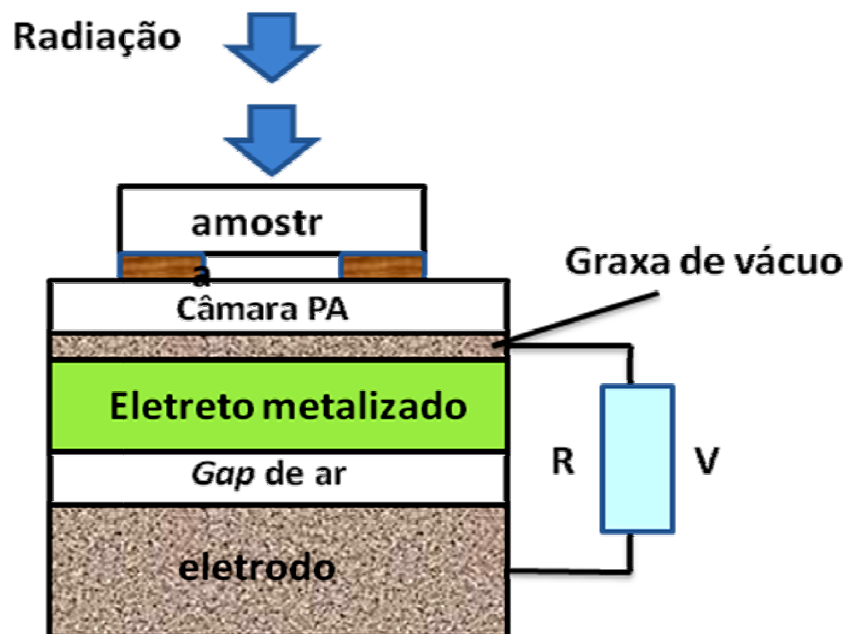


Figura 38 - Esquema do microfone de eletreto.

De uma forma geral existem três mecanismos de geração de sinal acústico: difusão, expansão e termoelástico.

- *Mecanismo de difusão:*

A energia térmica gerada na superfície exposta à incidência de uma radiação luminosa modulada se difunde pela amostra até atingir a superfície oposta que está voltada para o interior do microfone. Ao atingir esse lado da amostra o calor é transferido, em forma de energia cinética, para as moléculas contidas no volume delimitado pela amostra e o microfone, aumento modulado da energia cinética, representa um aumento modulado da pressão dentro desse volume, (som). (Figura 38)

- Mecanismo de Expansão:

A expansão e contração volumétrica da amostra devido ao acúmulo de energia térmica gerado pela incidência de uma luz modulada e pode resultar numa alteração do volume da câmara fotoacústica.

- Mecanismo Termoelástico:

Dependendo do tipo de material a ser caracterizado (baixa difusividade térmica), ocorre um gradiente de temperatura na direção z. Tal gradiente é responsável por uma expansão maior da amostra no lado voltado para incidência de luz em relação ao lado que está fixo no microfone. Assim, uma vez que a luz incidente está modulada, ocorre a deflexão elástica periódica da amostra sobre o microfone e assim a geração do sinal acústico. Esse é o mecanismo predominante em materiais poliméricos.

3.4 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA - NÚCLEO

3.4.1 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMAGNETITA (NÚCLEO)

Para a preparação das microcápsulas de magnetita (Fe_3O_4), foi empregado método de co precipitação (Yang et al.,2008). No reator, foi colocados 50 mL de cada uma das soluções aquosas de sais de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5M e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,75 M) acrescidos de 50 mL de água também deionizada, resultando num volume total de 150mL.

Sob atmosfera de nitrogênio e temperatura de 60°C, serão adicionados 13 mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônia 28% w/w. Após a adição, deve-se observar a mudança de cor para uma coloração escura.

O precipitado foi isolado por decantação magnética e lavado 3 vezes com água destilada para eliminar o excesso de NH_3 . Por fim, as microcápsulas foram secas à temperatura ambiente e vácuo e, após macerar e peneirar (100mesh), as mesmas serão caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando o equipamento Shimadzu, modelo SSX-550, disponível no LAMAV/CCT, para a análise morfológica das microcápsulas magnéticas.

3.4.2 – PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE *SPRAY-DRYING*.

Várias técnicas de microencapsulamento são descritas na literatura. Grande parte delas são baseadas no uso de solventes orgânicos para preparação das microcápsulas, tais como separação de fase orgânica, secagem a jato *spray drying*, evaporação de solvente.(Breitenbach et al, 2000)

O *spray drying* é a técnica mais utilizada nas indústrias química (plásticos, cerâmicos, fertilizantes e pigmentos), alimentação (leite em pó) e farmacêutica (extratos de plantas, materiais naturais e excipientes). O objetivo desta técnica é obter um produto seco, mais concentrado e de fácil conservação ou de manuseio do que os processos de extração de soluções. Pode-se assumir que a secagem quase instantânea do produto evitará ao máximo sua hidrólise, oxidação e sua decomposição.

A preparação de microcápsulas por *spray drying* oferece uma série de vantagens: menor dependência da solubilidade do agente ativo do que os métodos de evaporação do solvente, as condições de processamento são mais suaves e adequadas para a formulação de microcápsulas carregadas com proteínas e peptídeos, é um processo contínuo de fácil alimentação e de maneira gradual.

Na técnica de *spray drying*, um líquido na forma de *spray* é secado e coletado, sendo o resíduo o produto final. A técnica de *spray drying* é utilizada em várias indústrias, tais como na indústria de alimentos e farmacêutica na produção de materiais plásticos e cerâmicos. Ela é adequada para materiais que sejam sensíveis ao calor, devido ao processo de secagem ser rápido o material não precisa ser submetido a altas temperaturas para concluir a secagem dentro de um tempo razoável.

O processo de *spray drying* pode ser dividido em três etapas:

- Atomização do líquido por um redemoinho, pressão ou atomizador pneumático e entradas deste em câmara de secagem.
- Secagem das gotas do *spray* por um fluxo de gases aquecidos, produzindo um resíduo na forma de pó.
- Remoção do pó do meio de secagem, usualmente por meio de um separador ciclone.

A Figura 39 mostra o diagrama de blocos para o processo de pulverização das microcápsulas pela técnica de *spray drying*.

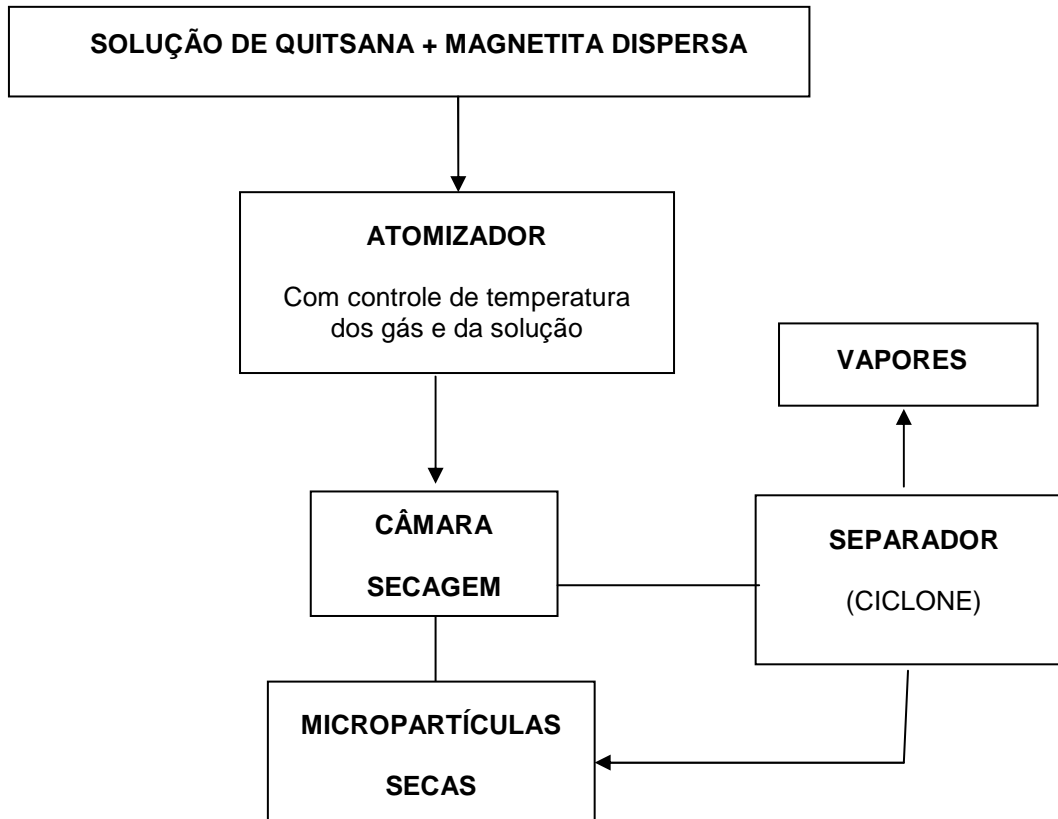


Figura 39 - Processo para formulação das microcápsulas pela técnica de secagem por pulverização (*spray drying*).

As microcápsulas foram obtidas utilizando o equipamento SD-04 *Laboratory Scale Spray Drier*, disponível no setor de polímeros (SEPOL).

3.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM O NÚCLEO DE NANO-MAGNETITA

3.5.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias de varredura foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu SSX-550, disponível no LAMAV/CCT para a nanomagnetita sintetizada e para as microcápsulas formuladas para determinar sua morfologia e tamanho das partículas. As microcápsulas foram depositadas num porta-amostra com fita adesiva de grafite e recobertas com um filme de ouro de 20 nm para não sofrerem descargas durante a análise.

3.5.2 – 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 0,1µg, nos termopares de platina de 0,001°C, disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL).

Foram utilizadas amostras de polímero de aproximadamente 10mg em painéis de platina de 90µL. 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 foi 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 N₂, 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.

3.5.2 – POROSIDADE

As microcápsulas foram testadas com objetivo de caracterizar a porosidade. Para a quitosana e outros biopolímeros, a porosidade pode ser influenciada pelos seguintes fatores: a rota de preparação e as modificações químicas. Na etapa de preparação, os parâmetros mais importantes foram a concentração da solução de quitosana e a concentração da solução de NaOH (Beppu e Santana, 1999). Com objetivo de maximizar os valores de porosidade, foram usados altos valores de concentração, aproximadamente 2,0 %, em massa, de quitosana e 1 M de NaOH.

O nome BET, da técnica de adsorção de gás, foi designado em homenagem aos três pesquisadores que desenvolveram a teoria de adsorção de gás para efetuarem medidas de área superficial específica Brunauer, Emmett e Teller, que trabalharam com a isoterma de adsorção de multicamadas de gás de forma similar a Langmuir, que equacionou a monocamada adsorvida. A isoterma é a relação entre a quantidade de gás adsorvido e a pressão do gás a certa temperatura.

A adsorção de gás ocorre em qualquer sólido, sendo dependente da temperatura, pressão e superfície. A adsorção física dos gases é promovida por forças do tipo Van der Waals. O equilíbrio da adsorção física do gás é rápido, pois não envolve energia de ativação e é um processo reversível.

Para a realização das medidas para as microcápsulas formuladas foi utilizado o equipamento de adsorção de gás Autosorb-1 da Quantachrome Instruments pertencente ao LCQUI/UENF.

Para a análise, o material foi secado em estufa (para retirada de umidade) e pesado para que, assim, possa ser colocado no portas-amostra, que será acoplado ao equipamento. Será realizado um pré-tratamento a 90°C por 24h para posteriormente, realização das medidas de área superficial específica e de porosidade.

A área superficial total das amostras submetidas a esta análise foi calculada pelo equipamento através do nitrogênio adsorvido (m^2), a partir do volume de gás adsorvido (V) em função da pressão relativa (P/P_0). A área superficial foi medida e dividida pelo peso total da amostra testada (g), a fim de se obter a área superficial específica ($m^2 \cdot g^{-1}$).

3.5.3 – MEDIDAS DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETÔMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE

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 (Bordini, 2006)

As propriedades magnéticas foram estudadas utilizando um magnetômetro Vibrational OXFORD VSM, Modelo 3001(Figura 40) com um campo magnético com eletroímã máximo de 1,6 Tesla e sensibilidade de 10^{-5} emu, que serão realizados no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), todos serão realizados em temperatura ambiente, usando um campo externo de 2 KOe para varrer o campo na origem da curva inicial de magnetização.



Figura 40 - Magnetômetro de Amostra Vibrante marca OXFORD VSM, Modelo 3001 utilizado para as análises

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados pretendidos neste trabalho são o desenvolvimento de um suporte com propriedades magnéticas a partir da quitosana para a imobilização de enzimas com vista a sua utilização na produção de biodiesel.

Com este propósito numa primeira parte deste capítulo são apresentados e discutidos resultados referentes a caracterização da quitosana e alguns materiais preparados a partir da quitosana modificada procurando materiais com morfologia e propriedades apropriadas que possam vir a ser utilizados na formulação de um suporte para a imobilização de enzimas com propriedades magnéticas.

4.1 – CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA

Os filmes densos formulados com a técnica de evaporação do solvente (*casting*) a partir da quitosana foram caracterizados e utilizados como referência na avaliação dos materiais modificados.

4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QUITOSANA

A Figura 41a) mostra a micrografia de superfície da quitosana obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes da neutralização com NaOH. Observa-se uma superfície aparentemente lisa e contínua caracterizando o filme como denso.

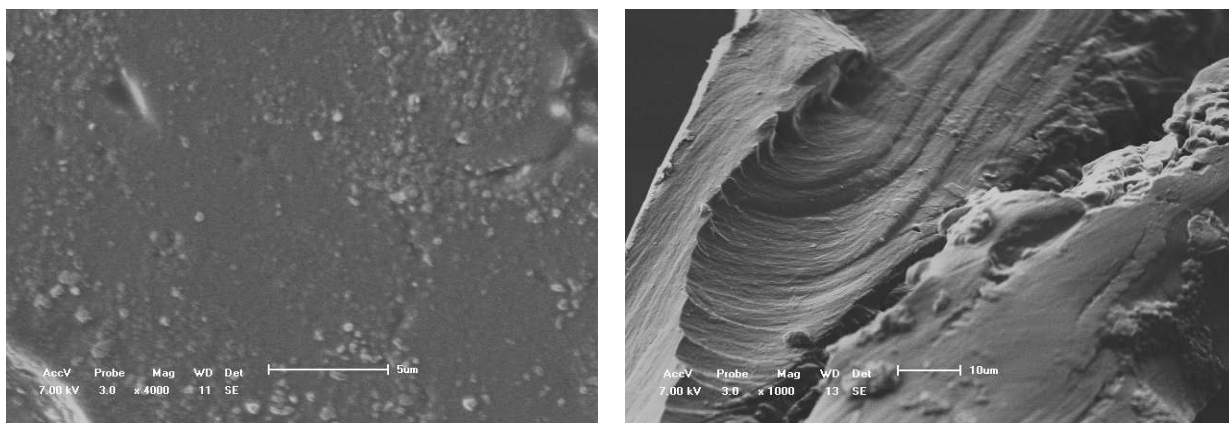


Figura 41 - Imagens MEV da superfície do filme de quitosana (a) e da seção transversal do filme de quitosana (b).

Na Figura 41(b) a seção transversal do filme de quitosana, apresenta-se contínua, com aspecto denso, não observando-se poros no volume.

As imagens de superfície do filme de quitosana por microscopia de força atômica mostradas nas Figuras 42 e 43. permitem associar a superfície a existência de um certo nível de rugosidade relativamente regular ($R_a = 1,323 \text{ nm}$)(Figura 42).

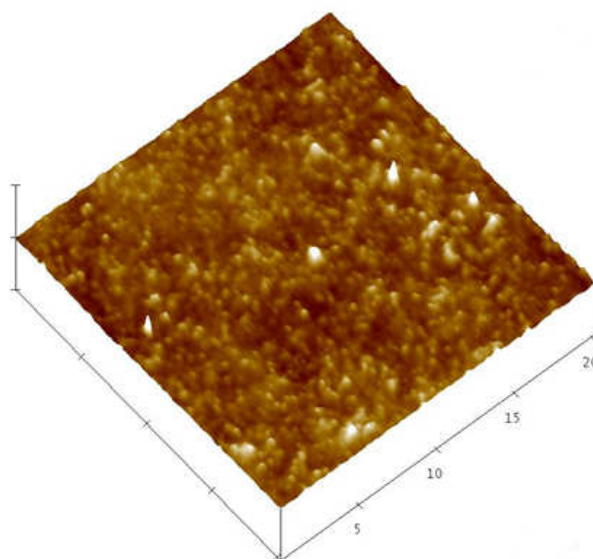


Figura 42- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de quitosana com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

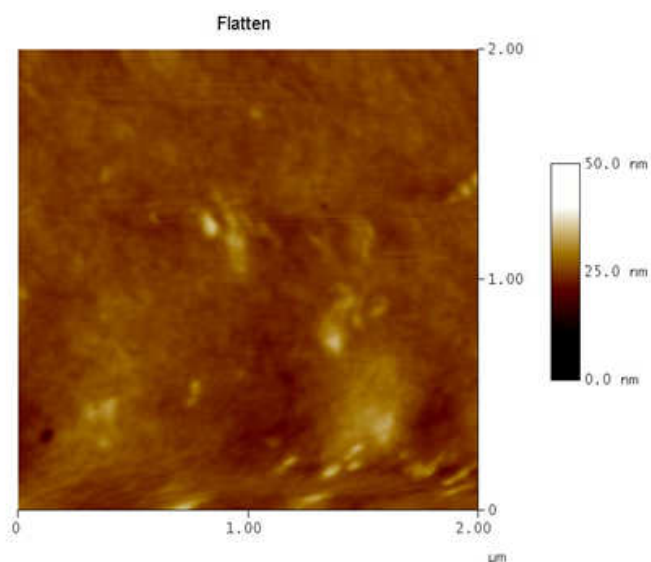


Figura 43 - Microscopia de força atômica mostrando morfologia da superfície do filme denso de quitosana com 2 μ m x 2 μ m de área.

4.1.2 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DE QUITOSANA.

Os filmes poliméricos densos foram submetidos à análise por difração de raios X. O difratograma do filme de quitosana (Figura 44) apresenta no eixo 2θ sinais a 10,5°, 19,9°, 22,2° e 28,0°, (Ritthidej,2002) correspondendo a

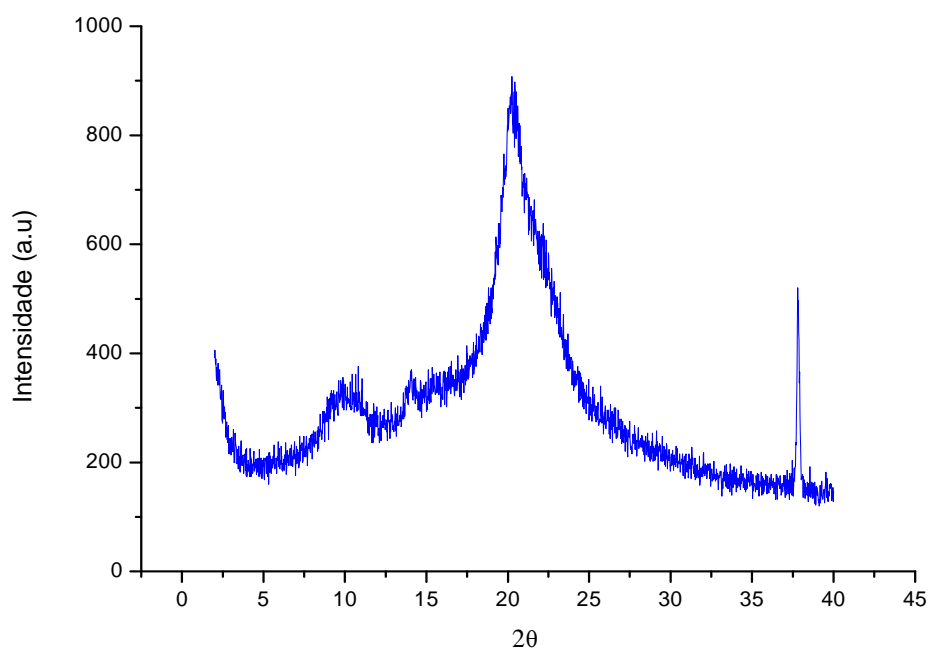


Figura 44- Difratograma do filme de quitosana neutralizado.

Nesta faixa para 2θ entre $10^\circ - 40^\circ$, a tendência a formação de bandas largas em lugar de sinais finas são consequência da fase amorfa, originando um difratograma característico de um polímero semicristalino (SVETLANA, 2008). O filme de quitosana apresentou 56,8% de cristalinidade.

4.1.3 – ESTRUTURA DA QUITOSANA: ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.

O espectro infravermelho (ATR) da quitosana (Figura 45) está caracterizado pela presença de uma sinal larga com máximo em torno de 3420 cm^{-1} , atribuída à deformação axial do grupo O-H associado a outros grupos polares através de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares.

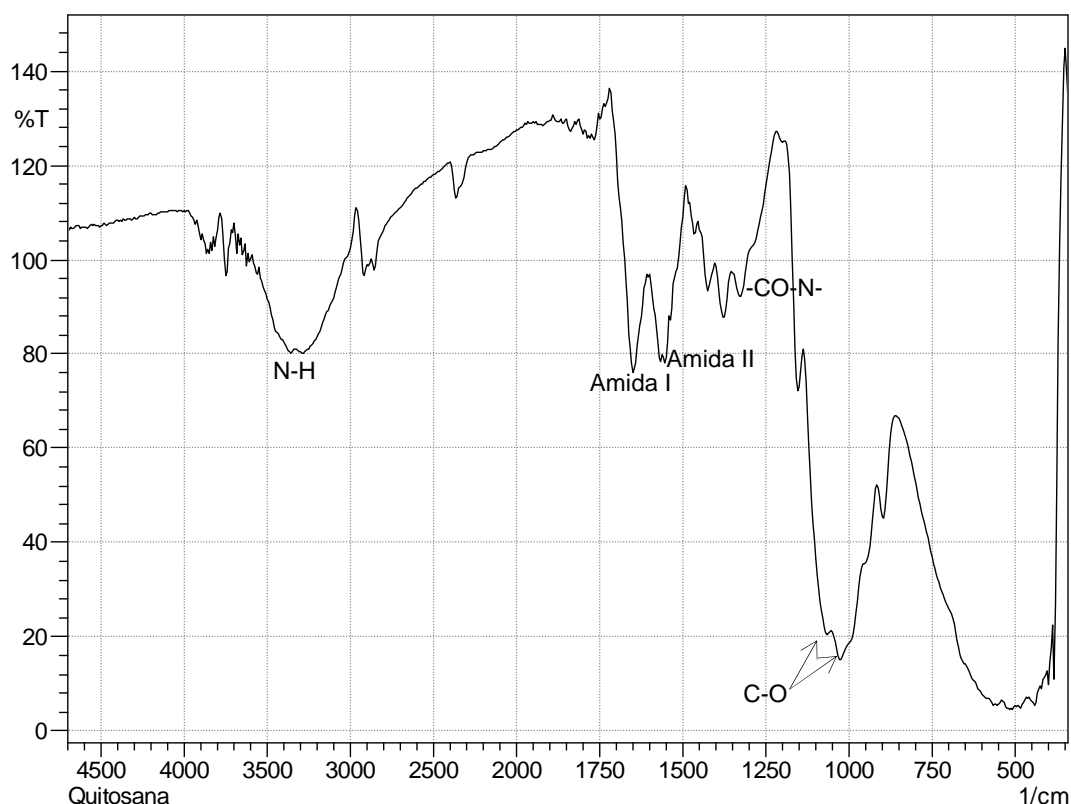


Figura 45 - Espectro de infravermelho (ATR) da quitosana.

Na região, próximo a 3300 cm^{-1} , também tem lugar a deformação axial N-H, normalmente obscurecida pela formação de pontes de hidrogênio com os grupos

OH. Sinais característicos são a 1650 cm^{-1} , correspondente a amida I, 1560 cm^{-1} , relacionada a amida II, 1070 e 1030 cm^{-1} , devido ao estiramento C-O, 1314 cm^{-1} devido ao grupo -CO-N-. O sinal intenso entre 800 e 1200 cm^{-1} está relacionado com os anéis piranosídicos.

4.1.4 – COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE DA QUITOSANA.

Foram realizadas medidas de coeficiente de permeabilidade a água dos filmes de quitosana em diferentes temperaturas (50°C , 55°C e 60°C), utilizando uma técnica termogravimétrica conforme descrito na metodologia.

O objetivo desta determinação é avaliar o impacto da modificação na permeabilidade a vapores de água e sua possível correlação com as propriedades do suporte catalítico, estes coeficientes de permeabilidade não estão disponíveis na literatura.

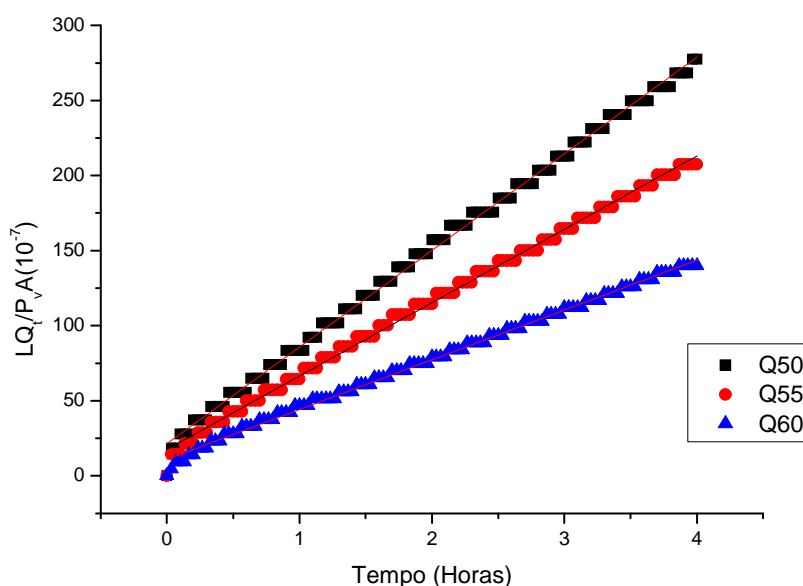


Figura 46 - Curva de tempo de retardo para o filme de quitosana utilizando água como permeante a diferentes temperaturas.

A solubilidade do vapor na matriz para o filme de quitosana nas temperaturas de 50° e 60° se modificam sensivelmente isto significa que provavelmente ambas

estão governadas pelas interações tipo ponte hidrogênio e energia envolvida é da mesmo ordem de grandeza.

4.2 – MODIFICACAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: BLENDA

4.2.1 – MORFOLOGIA DAS BLENDA.

As propriedades da quitosana podem ser modificada a partir da formação de blendas que possam vir modular especificamente o balanço hidrofóbico/hidrofílico, cristalinidade, propriedades mecânicas e de transporte de massa as quais devem influenciar na efetividade do suporte catalítico.

Foram utilizados como polímeros modificadores o polióxido de etileno (PEO) e copolímeros deste com o polietileno.

O filme preparado com a blenda Q/PEO (80/20) m/m (Figuras 47(a) e (b)) possui uma superfície discretamente rugosa (a).

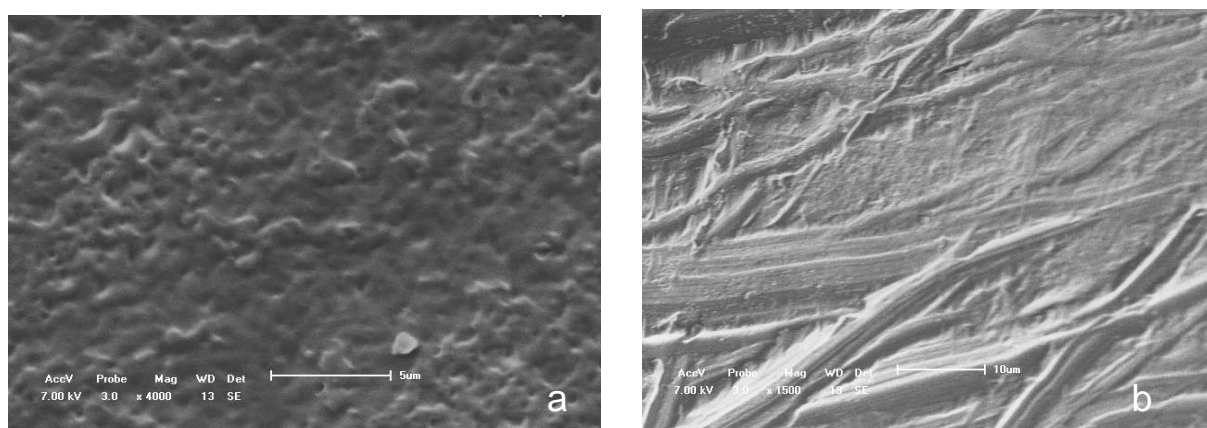


Figura 47 – Imagens de MEV: (a) Superfície e (b) Seção transversal no filme de Q/PEO (80/20).

Essa alteração na rugosidade da superfície do filme em relação ao filme de quitosana (Figura 41) pode estar relacionada à solubilização parcial do PEO, durante a neutralização e lavagem do filme, si consideramos que não foram observadas nos filmes de quitosana após neutralização devido a possível formação de vazios após

neutralização (AMIJI, 1995). Na Figura 47(b) a seção transversal do filme apresenta um aspecto de fibras entrelaçadas imersas numa matriz densa.

As imagens de AFM, para esta blenda de Q/PEO (Figuras 48 e 49), mostram que a adição de PEO na preparação da blenda origina certamente um filme com morfologia mais irregular, rugosa, ($R_a = 59,438 \text{ nm}$) que o da quitosana (Figura 41).

A imagem do filme (Figura 48) permite destacar a existência de “poços” mais profundos. A conclusão, provavelmente a mais relevante, é que não se observa a segregação da fase de PEO ou seja, nas proporções utilizadas a mistura é homogênea.

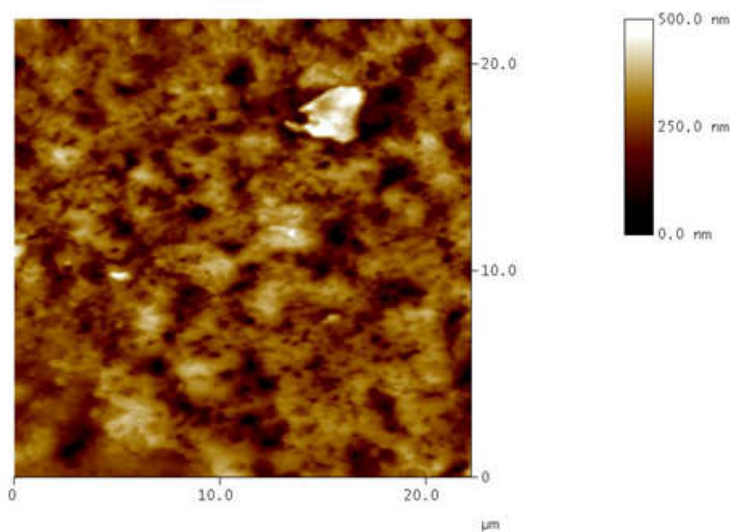


Figura 48 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

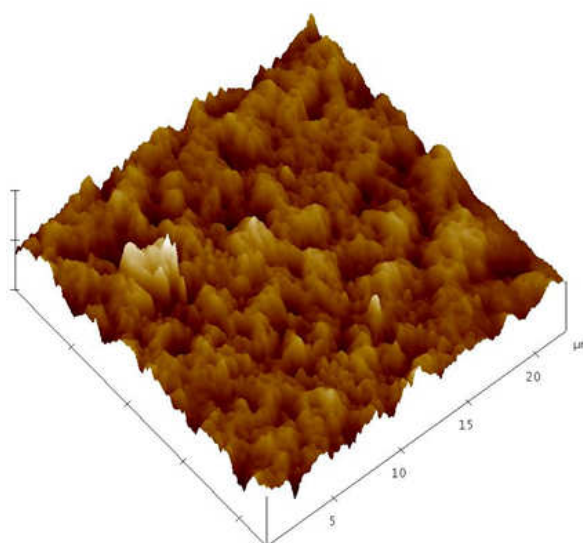


Figura 49 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PEO com $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ de área.

Para a mistura de quitosana/PE-b-80%-PEO (80/20) m/m, os filmes preparados apresentam uma superfície, Figuras 50(a) e (b), aparentemente mais lisa que a observada para a blenda Q/PEO com a presença de defeitos em sua superfície entretanto a principal diferença se observa na seção transversal, extremadamente regular e de aspecto microporoso.

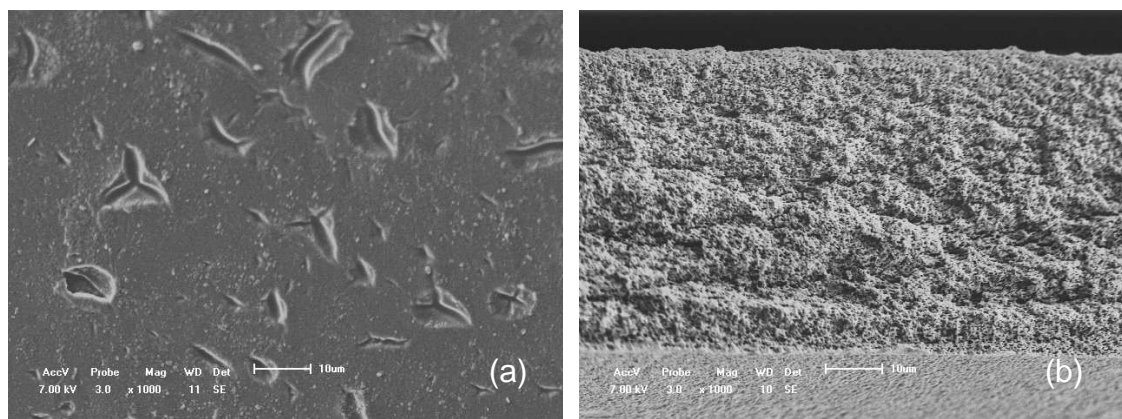


Figura 50- Imagens de MEV: (a) superfície e (b) seção transversal do filme de Q/ PE-B-80%-PEO (80/20).

A microscopia de força atômica destes filmes (Figuras 51 e 52) da blenda Q/PE-b-80%PEO indicam que a superfície é mais rugosa ($R_a = 53,340$ nm) que a do filme de quitosana.

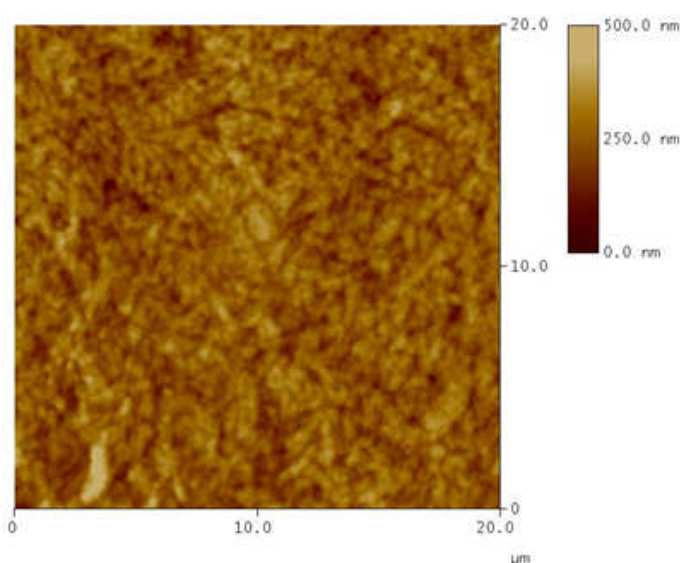


Figura 51 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.

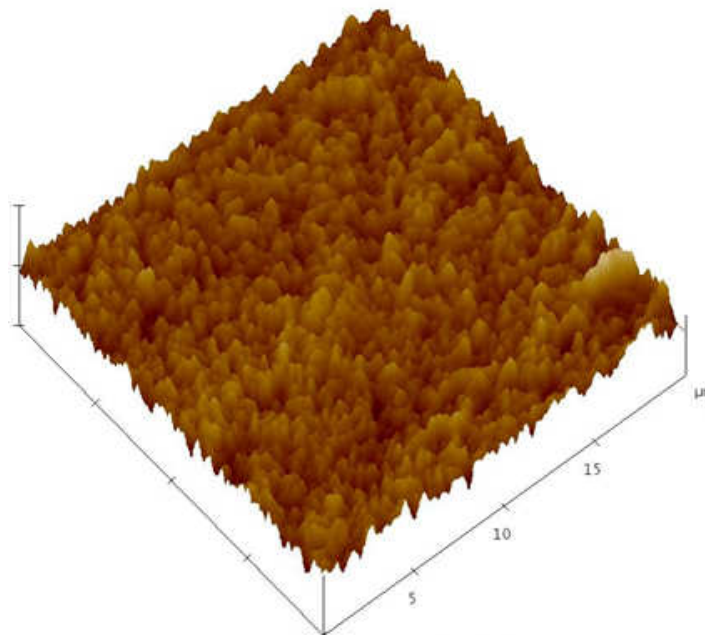


Figura 52 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

Uma vez que para efeitos de análises do impacto da presença do PEO na morfologia das blendas, analisamos a morfologia de blenda Q/PE-b-50%-PEO (80/20) m/m que apresenta a menor contribuição de PEO à mistura (Figura 53) pode-se observar uma menor rugosidade quando comparada com a blenda Q/PEO (Figura 48).

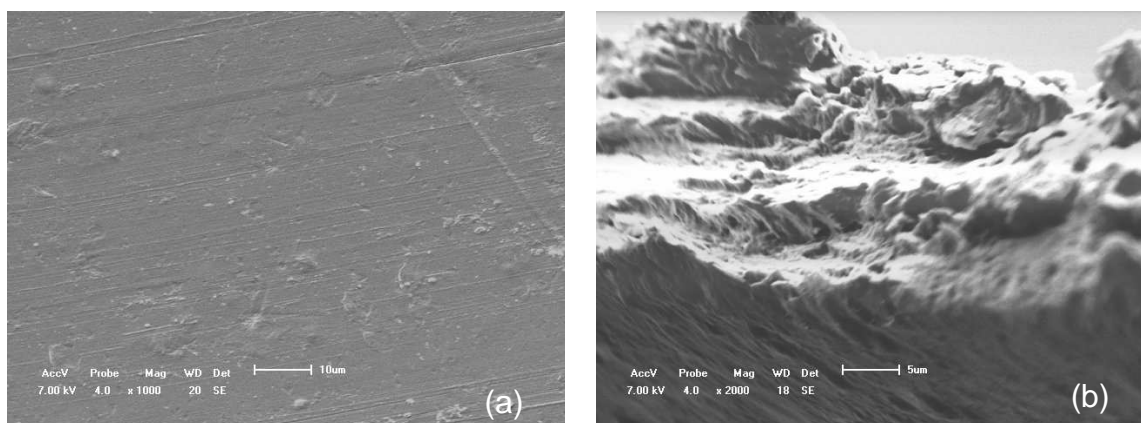


Figura 53 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-B-50%-PEO (80/20) e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/PE-B-50%-PEO.

As Figuras 54 e 55 mostram as imagens de superfície e topográfica, respectivamente, dos filmes da blenda Q/PE-b-50%PEO. A adição do copolímero com 50%PEO na preparação da blenda origina realmente uma redução da

rugosidade ($R_a = 93,409$ nm) comparada com a blenda com maior conteúdo de PEO (Q/PEO, Figura 48-49).

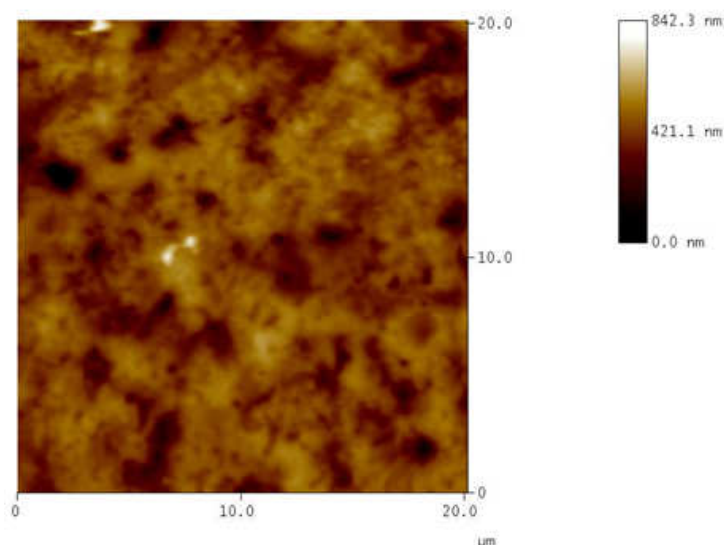


Figura 54- Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

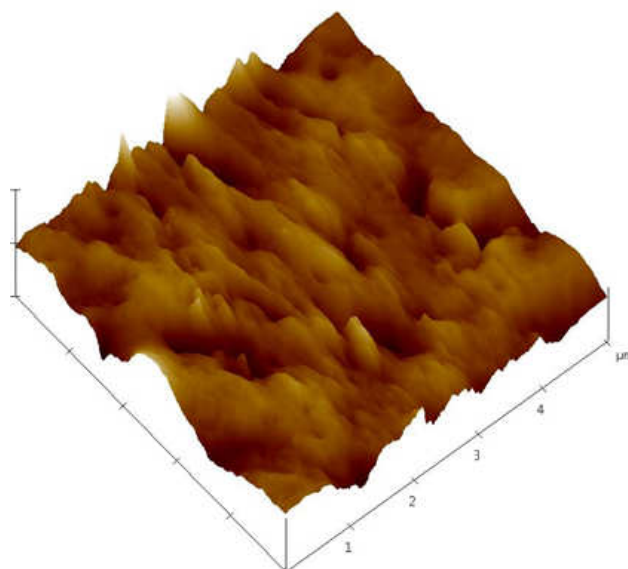


Figura 55- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

A adição do copolímero modificado PE-b-80%PEOCOOH na mistura com a quitosana (80/20) introduz a possibilidade de uma maior interação entre as fases proveniente da existência dos agrupamentos COOH no copolímero e o NH_2 na quitosana e assim mudanças mais acentuadas nas propriedades da blenda principalmente no referido a mudanças no balanço hidrofóbico/hidrofílico do suporte.

No filme da blenda Q/PE-b-80%PEOCOOH (Figura 56), se observam a presença de bolhas que não forma observadas no filme da quitosana provavelmente devido ao efeito do banho de NaOH sobre a fase PE-b-80%PEOCOOH e a contribuição de um possível efeito de aeração do filme.

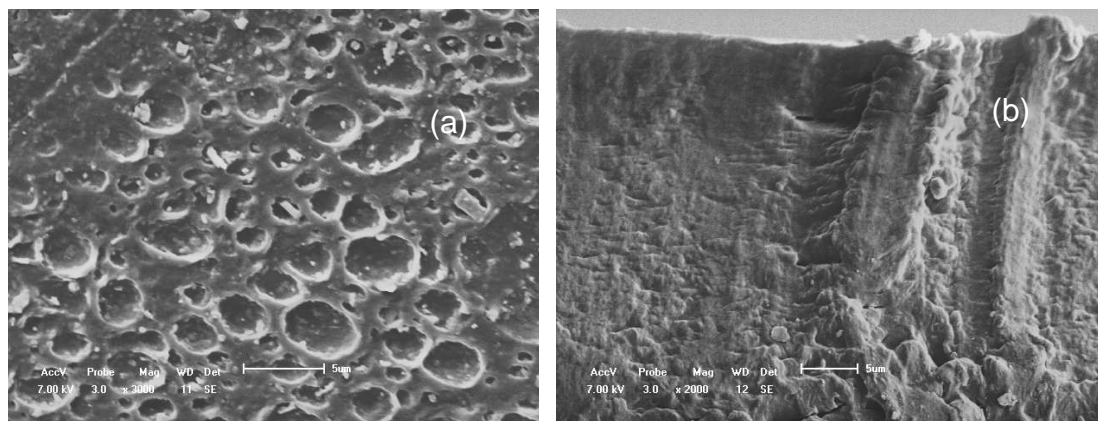


Figura 56 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-b-PEO-COOH e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-PEO-COOH.

As imagens de superfície e topográfica, Figuras 57 e 58 respectivamente, do filme da blenda Q/PE-b-80%PEOCOOH evidenciam a existência de uma topografia mais irregular que as blendas analisadas anteriormente e a quitosana pura.

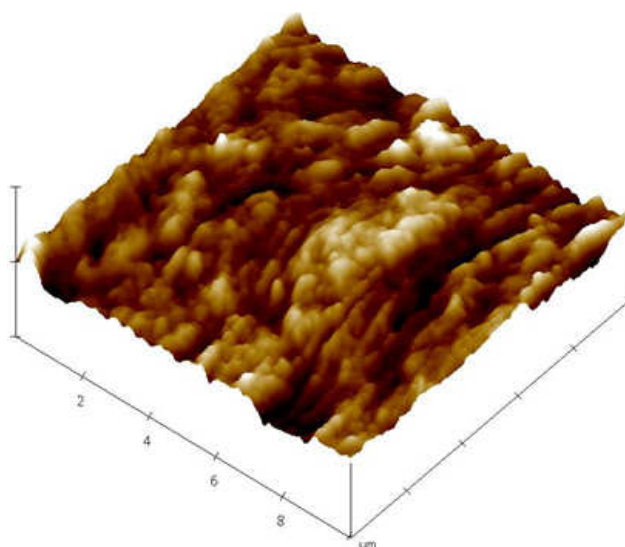


Figura 57- Microscopia de força atômica mostrando a topografia do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.

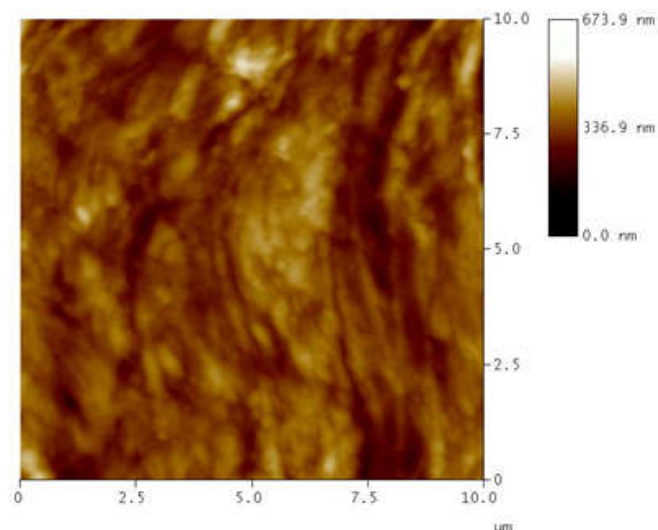


Figura 58 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20 μ m x 20 μ m de área.

A rugosidade encontrada ($R_a = 63,385$ nm) também é maior tornando o filme mais irregular. Este resultado, ao menos em teoria não era esperado considerando principalmente a possibilidade de uma maior interação entre as fases si comparado com as blendas de PEO e os copolímeros PE-b-x%PEO.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.

Tabela 1- Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.

Filme	R_a (nm)	R_q (nm)	z (nm)
Q	1,323	1,762	27,057
Q/PEO	59,438	77,995	792,17
Q/PE-b-80%PEO	53,340	67,265	569,06
Q/PE-b-50%PEO	93,409	137,98	1,226
Q/PE-b-PEOCOOH	63,385	87,543	1,028

4.2.2 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA CRISTALINIDADE.

A Figura 59 mostra os difratogramas de difração de raios X para os filmes de quitosana e o as blendas preparadas com o PEO os copolímeros PE-b-x%PEO.

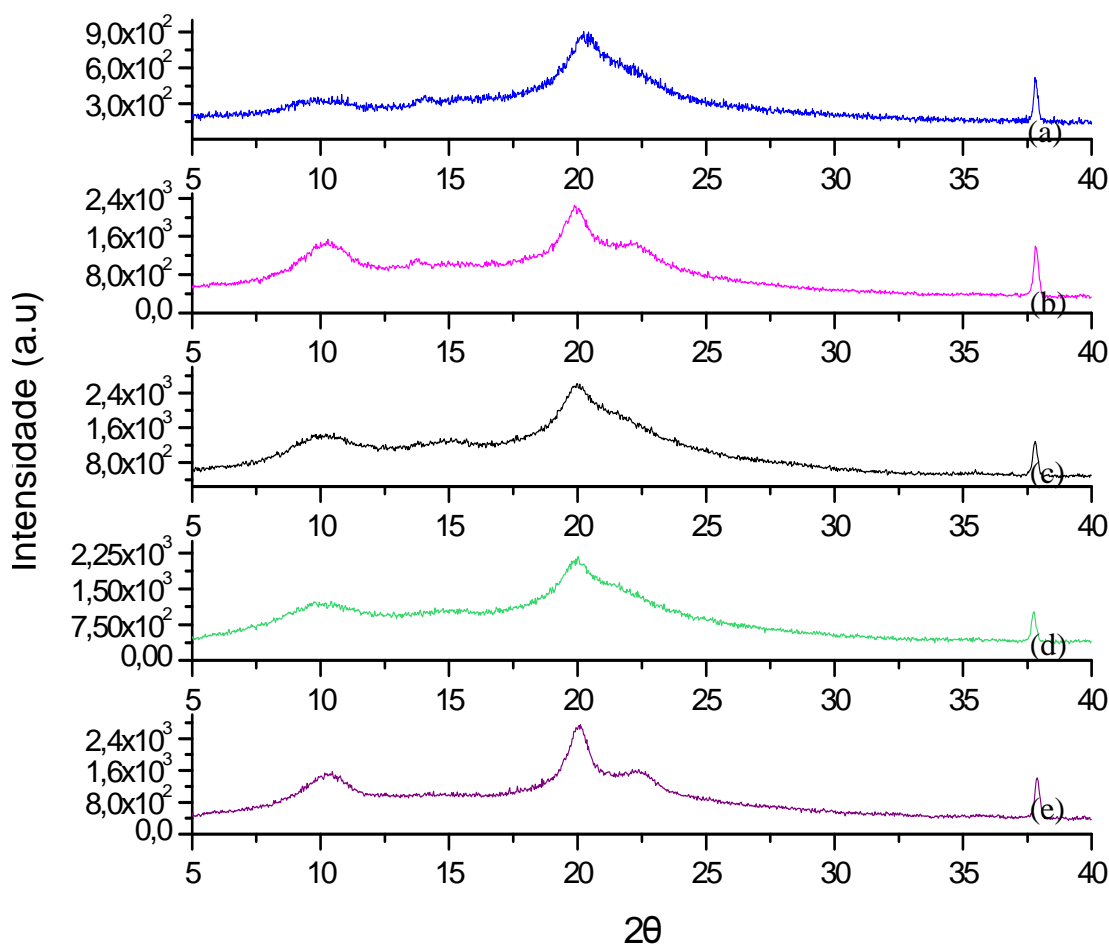


Figura 59 - Difratograma dos filmes de quitosana pura (a), Q/PE-B-50%-PEO (b), Q/PE-B-80%-PEO (c), Q/PE-B-PEO-COOH (d) e Q/PEO (e)

Os picos cristalinos da quitosana a $8,3^\circ$, $19,9^\circ$, $22,2^\circ$ e $28,0^\circ$, tem sua intensidade modificada nas misturas com o PEO e os copolímeros.

Os valores da percentagem de cristalinidade calculados (Tabela 2) indicam que a adição do copolímero com maior contribuição de PEO e do PEO se observa uma diminuição da cristalinidade na blenda mais acentuada quando maior foi a

presença do PEO em relação a quitosana não modificada e ainda maior para o copolímero PE-b-80%PEOCOOH.

Tabela 2 - Cristalinidade das blendas de quitosana.

Polímero	Cristalinidade (%)
Q	56,83
Q/PE-b-50%-PEO	57,69
Q/PE-b-80%-PEO	47,32
Q/PEO	40,47
Q/PE-b-%80PEOCOOH	29,08

Considerando a estrutura do PEO e do copolímero modificado Q/PE-b-%PEO-COOH, parece ser consequência de uma maior interação entre as fases o que pode vir a dificultar o processo de cristalização da quitosana.

4.2.3 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: INTERAÇÕES ENTRE AS FASES POLIMÉRICAS.

A análise das interações entre a quitosana e o polióxido de etileno e seus copolímeros nas blendas formuladas foi realizado com auxílio da espectroscopia infravermelha (Figura 60).

As absorções dos agrupamentos existentes nas estruturas do PEO e os copolímeros basicamente são mascaradas pelas absorções da fase em maior proporção (80%) a quitosana, apenas destaca-se a contribuição dos estiramentos C-H a 2900 cm^{-1} que faz modificar a relação de intensidade entre as sinais na região de 3400 cm^{-1} devida aos estiramentos OH.

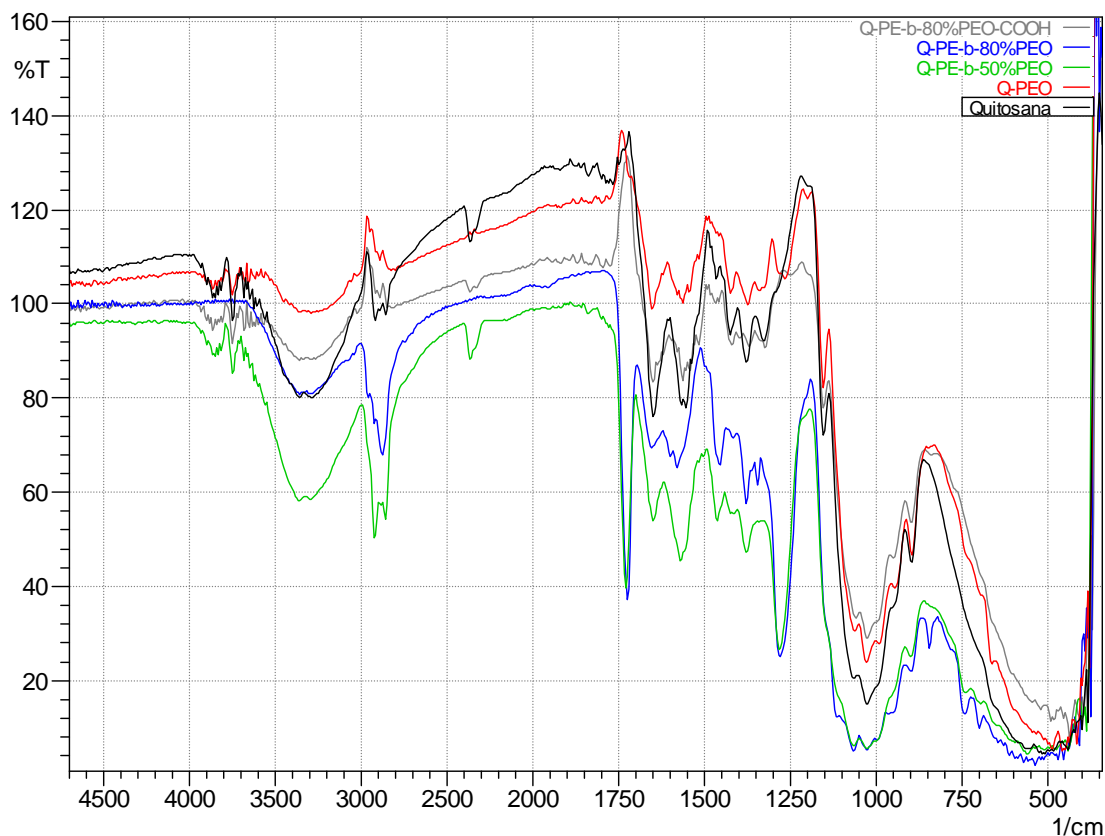


Figura 60- Espectros de infravermelho (ATR) da quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros PE-PEO.

Os espectros das blendas não acrescentam informação em relação as possíveis interações existentes entre as fases, responsáveis pela homogeneidade observada na microscopia eletrônica de força atômica.

4.2.4 – TRANSPORTE DE MASSA: PERMEABILIDADE

As medidas de coeficiente de permeabilidade para a quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros foram obtidas utilizando como permeante vapores de água em diferentes temperaturas (50°C, 55°C e 60°C) com o propósito de determinar as energias de ativação associadas ao processo de permeação destes vapores nos filmes densos.

As Figuras 61 - 63 apresentam as curvas de tempo de retardo (*time lag*) em função do tempo para as diferentes temperaturas para as blendas preparadas com o

PEO os copolímeros PE-b-x%PEO. As maiores diferenças observadas nestas curvas aparecem para a temperatura de 50 °C para as blendas de Q/PEO e Q/ PE-b-80%PEO.

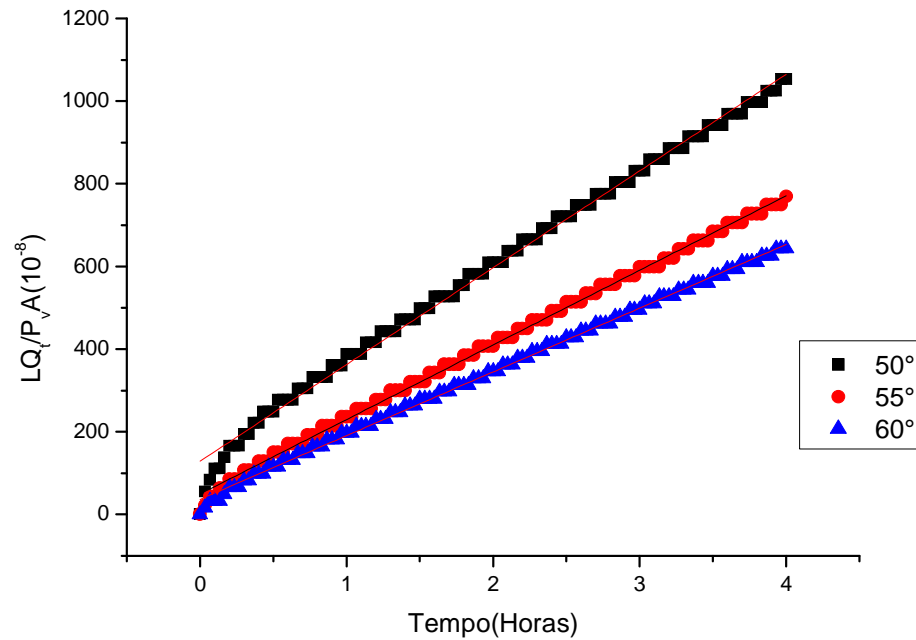


Figura 61- Gráfico LQ/PvA versus tempo para a blenda Q/PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C

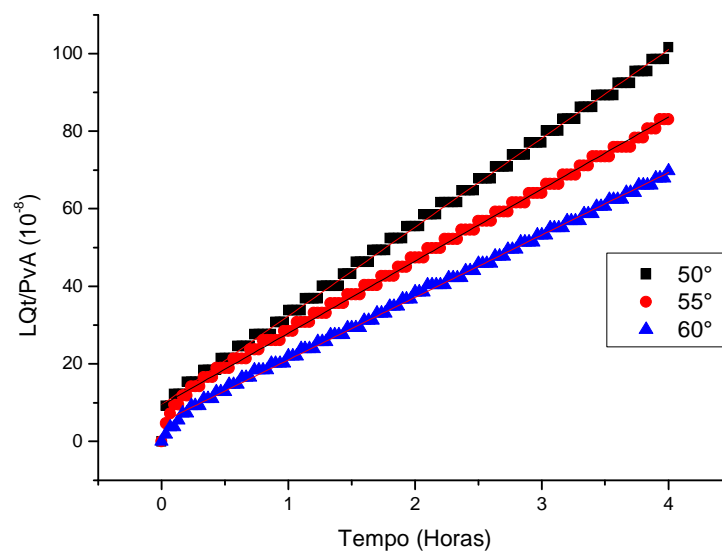


Figura 62- Gráfico LQ/PvA versus tempo para a blenda Q/PE-b-80%PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°

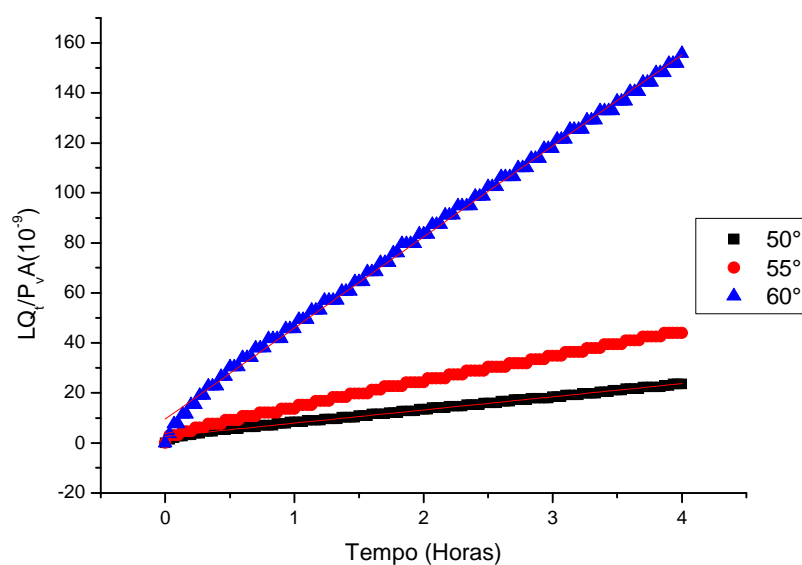


Figura 63- Gráfico LQ_t/P_vA versus tempo para a Q/PE-b-80%PEO-COOH nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C

Os valores de permeabilidade obtidos a partir do estudo do tempo de retardo (Tabela 3) a diferentes temperaturas apresentaram mudanças pequenas na inclinação das curvas (Figuras 21-23) para cada uma das blendas estudadas, diferentemente do observado para a quitosana. Este comportamento no caso das blendas indica uma fraca dependência com a temperatura na faixa de 50-60°C

Tabela 3 - Tabela de coeficientes de permeabilidade das blendas (inéditos não disponíveis na literatura).

<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Polímero</i>	<i>Coefficientes de permeabilidade (Barrer)</i>
50	Q	$6,44 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$2,34 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$2,29 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$5,27 \times 10^{-7}$
55	Q	$4,89 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$1,80 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$1,86 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$4,60 \times 10^{-7}$
60	Q	$3,32 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$1,54 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$1,61 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$3,64 \times 10^{-7}$

As diferenças nos valores de permeabilidade observados para a quitosana não podem ser explicados a partir da porcentagem de cristalinidade dos filmes de quitosana em relação a as blendas estudadas já que o efeito barreira da fase cristalina originaria uma diminuição do coeficiente de difusão e assim originar uma diminuição da permeabilidade ($P=DH$).

Uma explicação destes resultados pode estar relacionada com as interações específicas tipo ponte de hidrogênio que podem ter lugar entre o vapor da água e os grupos polares da quitosana o qual deve favorecer a permeação através do filme.

Em misturas poliméricas a permeabilidade é dependente da interação entre as fases. Assim nas blendas com o PEO e o copolímero PE-b-80%PEO a interação com as moléculas da água decresce e podem vir ser menores que as forças coesivas existente entre as moléculas da água ou que favoreceria a formação de “clusters”, diminuindo a permeabilidade deste filmes.

Na blenda da Q com Q/PE-b-80%PEO-COOH os valores de permeabilidade são maiores que nas outras blendas a consequência de sua menor cristalinidade e por tanto uma maior permeabilidade que a encontrada para a blenda Q/PEO e Q/PE-b-80%PEO.

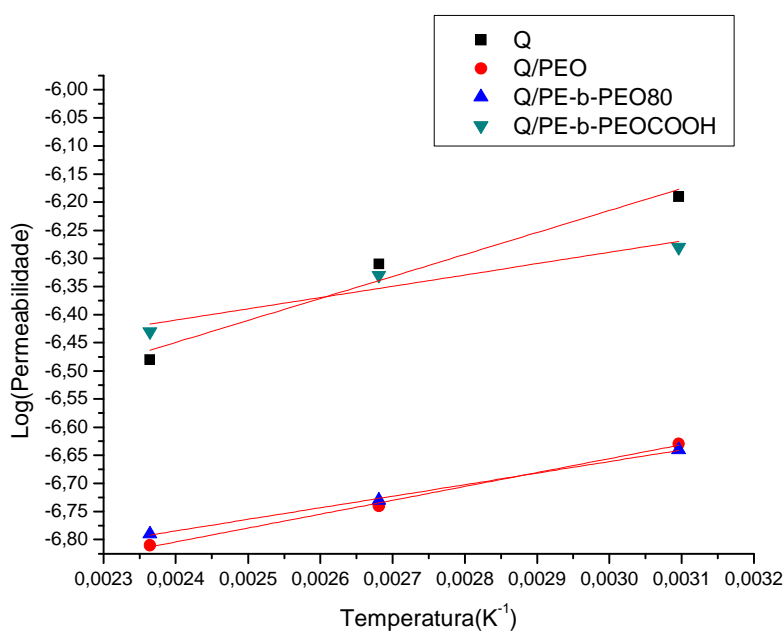


Figura 64- Coeficiente de permeabilidade em escala logarítmica versus o inverso da temperatura

As variações da permeabilidade para a quitosana e suas blendas a diferentes temperaturas (Figura 64) estão influenciadas principalmente pelo coeficiente de solubilidade (H) do diferentes filmes e no caso das blendas adicionalmente existe o efeito do PEO e os copolímeros nas propriedades da fase amorfa.

As energias de ativação associadas ao processo de permeação mostradas na Tabela 4 apontam diferenças entre a quitosana e as blendas que estão relacionadas com a maior mobilidade da fase amorfa nas blendas em relação a quitosana ou que favorecera a difusão das moléculas de permeante (água).

Tabela 4 Energias de ativação da permeação a água para as blendas de quitosana

<i>Blenda</i>	<i>Energia de ativação (KJ/mol)</i>
Quitosana	390,8
Q/PEO	246,9
Q/PE-b-80%PEO	205,5
Q/PE-b-80%PEOCOOH	200,7

Estes resultados reforçam a interpretação dada anteriormente. No processo de permeabilidade ($P = DH$) o coeficiente de solubilidade (H) da quitosana é que determina as diferenças encontradas em relação a suas blendas.

4.2.5 – DIFUSIVIDADE TÉRMICA

Foram realizadas medidas de difusividade térmica para caracterizar o comportamento térmico das blendas de quitosana (Figuras 65-67).

A Figura 65 apresenta a amplitude do sinal em função da frequência modulada para a blenda de Q/PEO, pode ser observado que para modulações de frequência de 10 Hz a escala de amplitude do sinal tem valor de $f^{0,062}$, este valor sugere que a blenda tem baixa flexão termo elástica. Na Figura 65 são apresentados os dados experimentais e o ajuste aos dados pela expressão teórica. O valor da difusividade térmica obtida a partir do ajuste dos dados foi $3,86 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$. Para a blenda de Q/PE-b-80%PEO apresentada na Figura 66, verifica-se que a amplitude do sinal diminui bruscamente para $f^{2,1}$ e nesta faixa a característica termo elástica é predominante e o valor da difusividade térmica tem um aumento significativo cerca de 55%, $5,99 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ do valor referente à blenda de Q/PEO.

A blenda de Q/PE-b-80%PEO-COOH mostrada na Figura 67, exibe um comportamento diferenciado, o valor de difusividade térmica é muito elevado $16 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, o ajuste dos dados experimentais é feito de forma a aproximar os dados do modelo teórico e neste caso a dispersão é muito alta, o que pode ser associado à interação do grupo carboxila deste copolímero modificado.

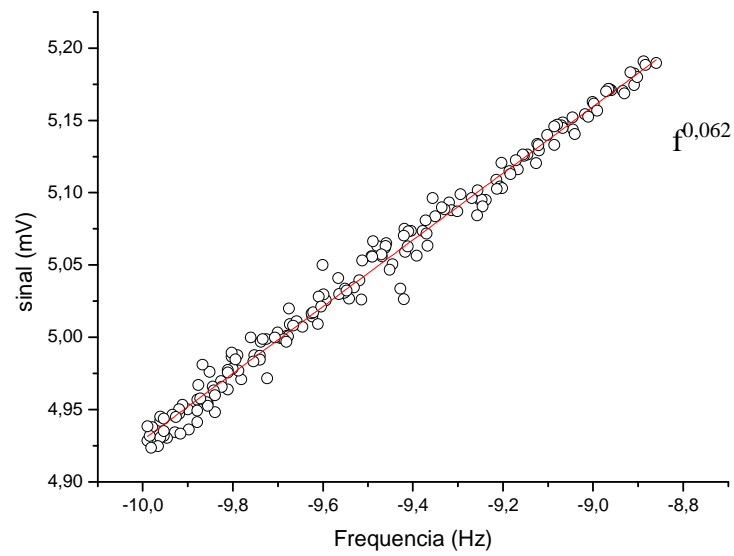


Figura 65- Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PEO.

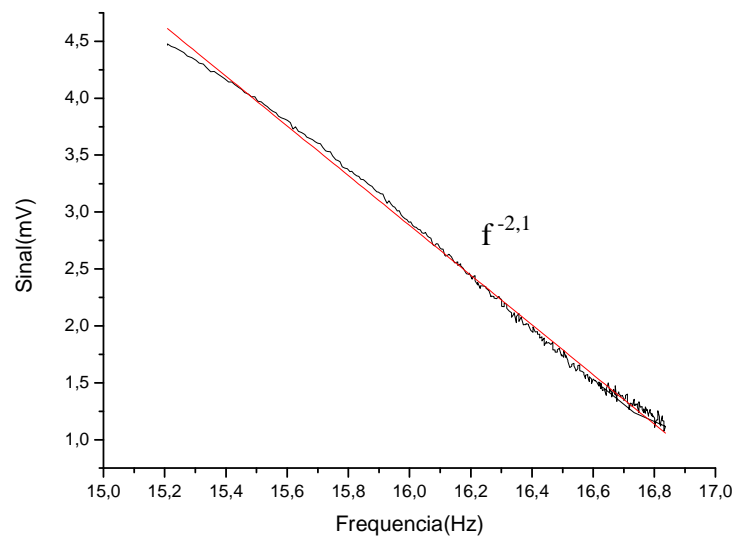


Figura 66 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO.

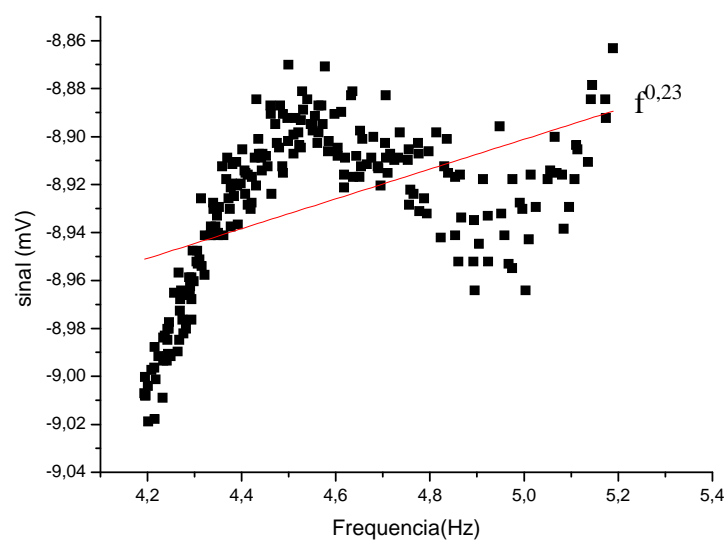


Figura 67 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO-COOH.

4.1.7 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TÉRMICA

Na Figura 68, apresenta-se a evolução temporal da temperatura para as blendas. Essa evolução permite obter a capacidade térmica específica, a curva superior representa o aumento de temperatura da amostra quando exposta à iluminação. A curva inferior representa a interrupção da chegada da luz à amostra após a temperatura da mesma atingir o patamar de saturação. A Tabela 5 resume os valores encontrados para a capacidade térmica específica após os ajustes experimentais.

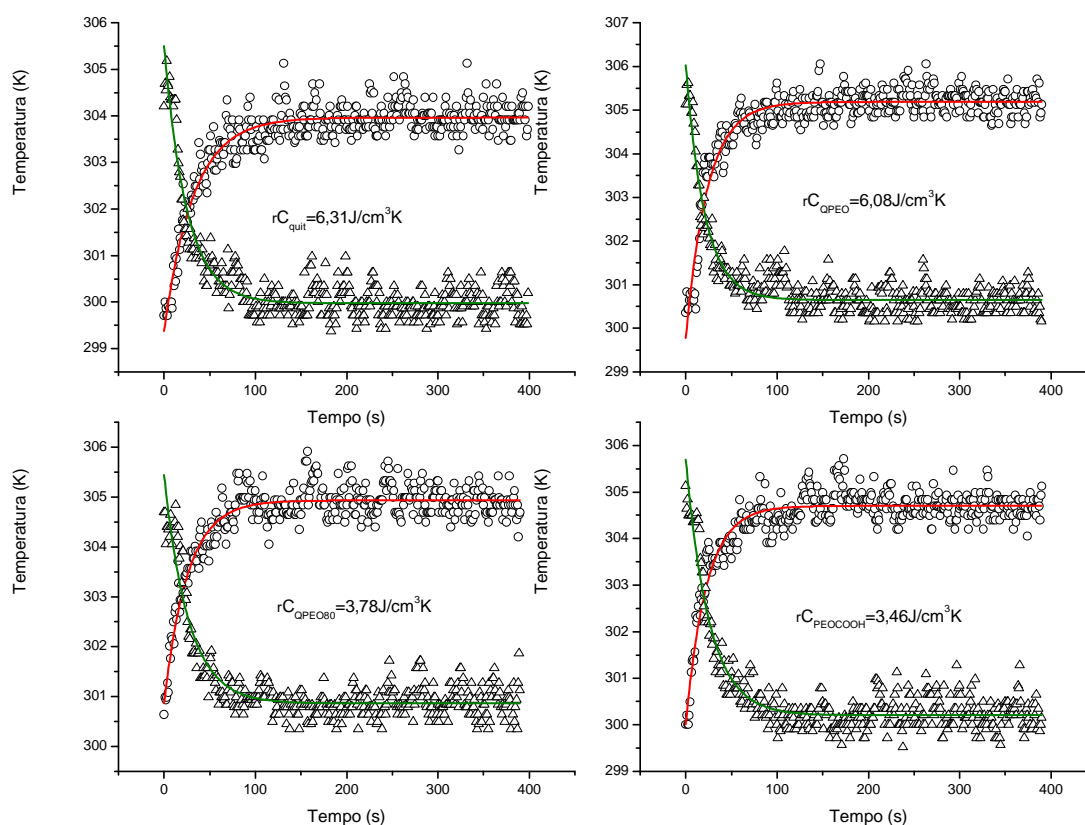


Figura 68- Evolução da temperatura com o tempo para as blendas

Tabela 5 - Propriedades térmicas das blendas obtidas através das propriedades fototérmicas

<i>Amostra</i>	<i>Capacidade térmica específica (J/cm³K)</i>	<i>Difusividade térmica (cm²/s)</i>	<i>Espessura do filme (μm)</i>
Quitosana	6,31	-	-
Q/PEO	6,08	$3,86 \times 10^{-4}$	56
Q/PE-b-PEO80%	3,78	$5,99 \times 10^{-4}$	87
Q/PE-b-PEO-COOH	3,46	16×10^{-4}	85

Nota-se que nos copolímeros ocorre uma queda no valor da capacidade térmica específica. Sendo a capacidade térmica específica a quantidade de energia

necessária para elevar em 1°C a massa do polímero ou a blenda é esperada esta diminuição uma vez que a energia de ativação para as blendas diminui em função da quantidade PEO nas blendas.

4.2.7 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO E MECÂNICO DA QUITOSANA E SUAS BLENDA.

As curvas calorimétricas diferenciais (DSC) da quitosana e as blendas com PEO os copolímero PE-b-%80 PEO e PE-b-80%PEO-COOH não apresentam um comportamento térmico marcadamente diferente.

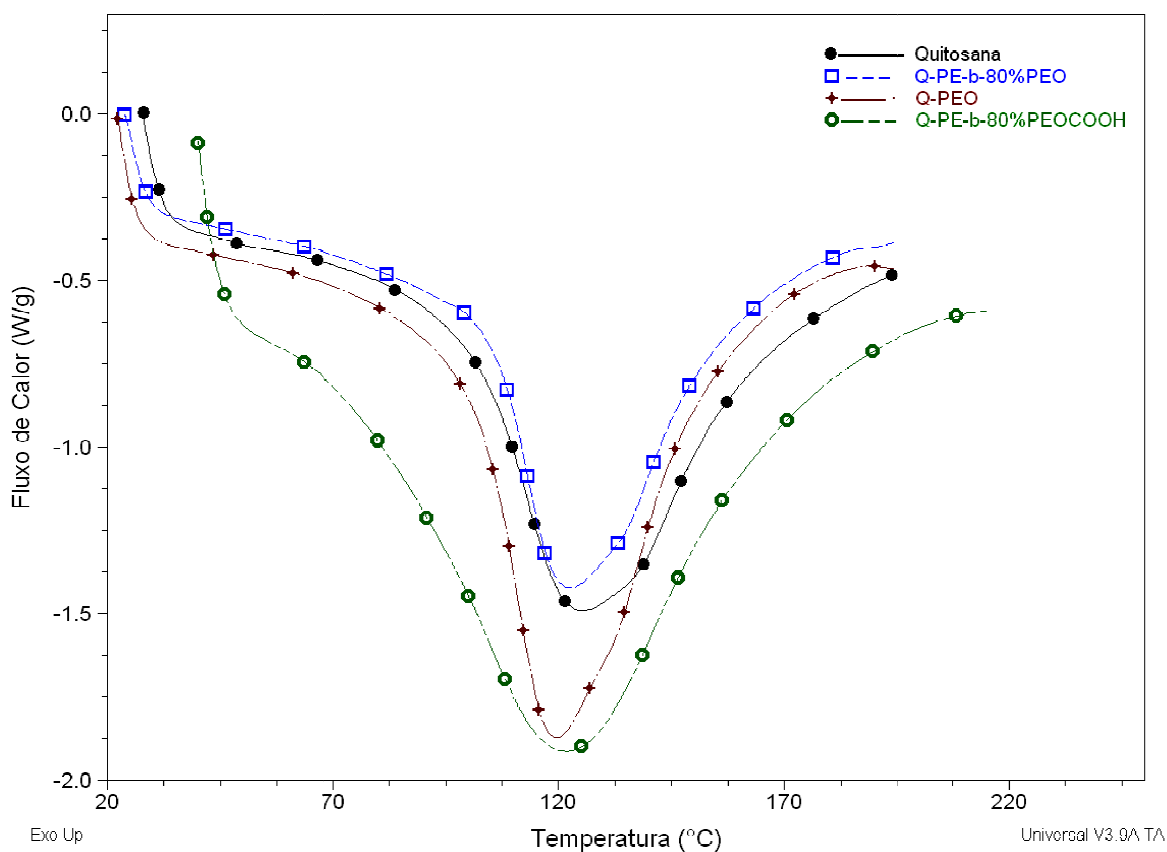


Figura 69 - Curvas de DSC para os filmes de quitosana e sua blendas

As temperaturas de fusão (Tabela 6) diminuem levemente na mistura com o PEO os copolímeros.

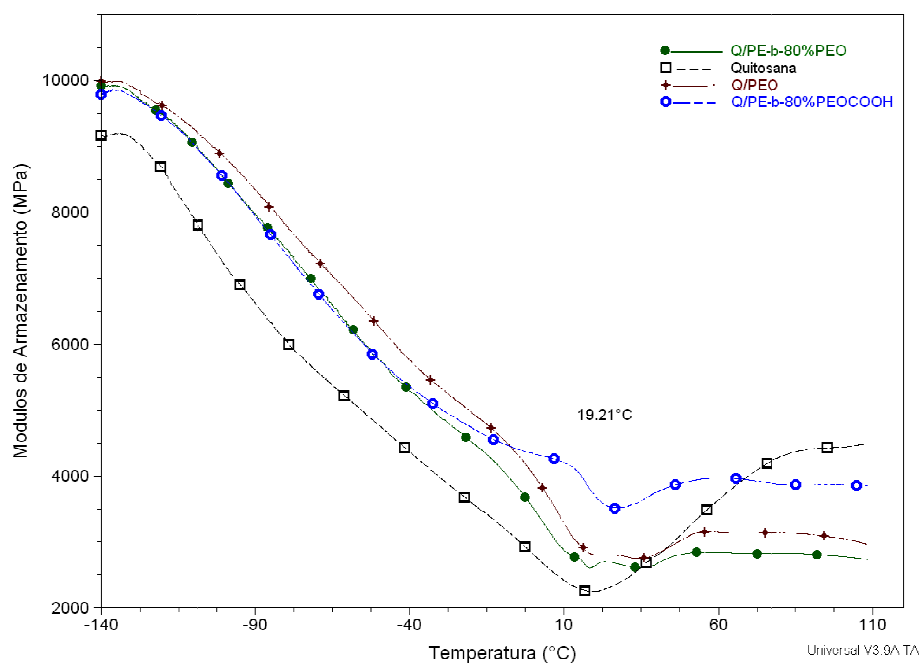
Tabela 6 - Temperaturas de fusão da quitosana e suas blendas

Polímero/Blenda	$T_m/^\circ\text{C}$
Q	125,5
Q-PEO	119,6
Q-PE-b-80%PEO	122,5
Q-PE-b-80%PEOCOOH	121,8

A diminuição da T_m acompanha principalmente ao conteúdo de PEO na mistura.

O comportamento dinâmico mecânico (DMA) (Figuras 70-72) dos filmes em estudo apresentam módulos com valores próximos. Sua principal diferença está no fenômeno de cristalização que se observa a partir de temperaturas próximas a 20 °C.

Nas blendas a cristalização e o impacto da cristalização é mais discreto, e como constatado nas análises por difração de raios x, acontece em menor extensão, apresentando módulos acima de 20°C menores que o da quitosana.

**Figura 70-** Módulo de armazenamento (E') para a quitosana e blendas

O comportamento observado nos módulos de perda (Figura 71) permite identificar a maior heterogeneidade das fases nas misturas.

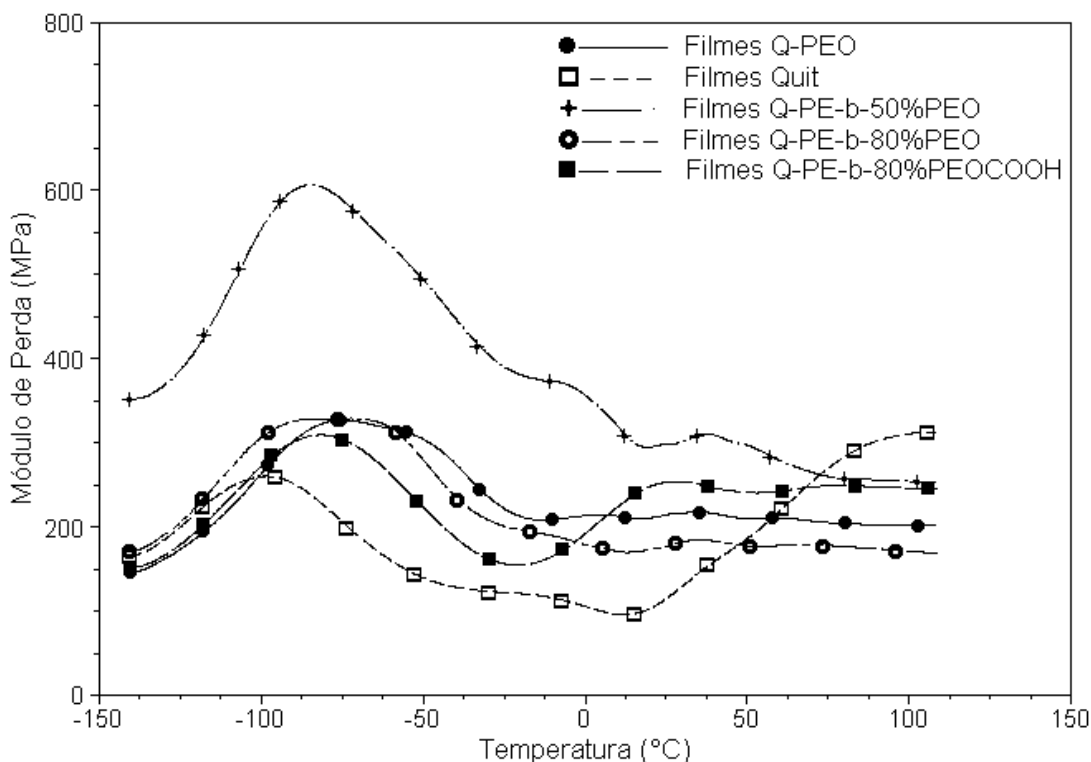


Figura 71- Módulo de perda para quitosana e blendas.

Em geral os filmes formulados com a quitosana modificada são mais rígidos que o de quitosana em temperaturas relativamente baixas (inferior a 10 °C). Entretanto em geral como pode ser constatado na Figura 71 a temperaturas acima de 20 °C os filmes das blendas com exceção da blend a com PE-b-50%PEO, parecem apresentar uma menor tendência a cristalizar (o módulo E' não aumenta) que o filme de quitosana.

Os registros da curva $Tg \delta$ (Figura 72) mostram uma relaxação β nas blendas e quitosana associada aos grupos (-CH₂OH) presentes na quitosana (Chao, 2004). As temperatura mais altas encontradas para estas transições nas blendas em relação a quitosana denota a existência de interação entre as fases, próprio de uma mistura ou blenda miscível.

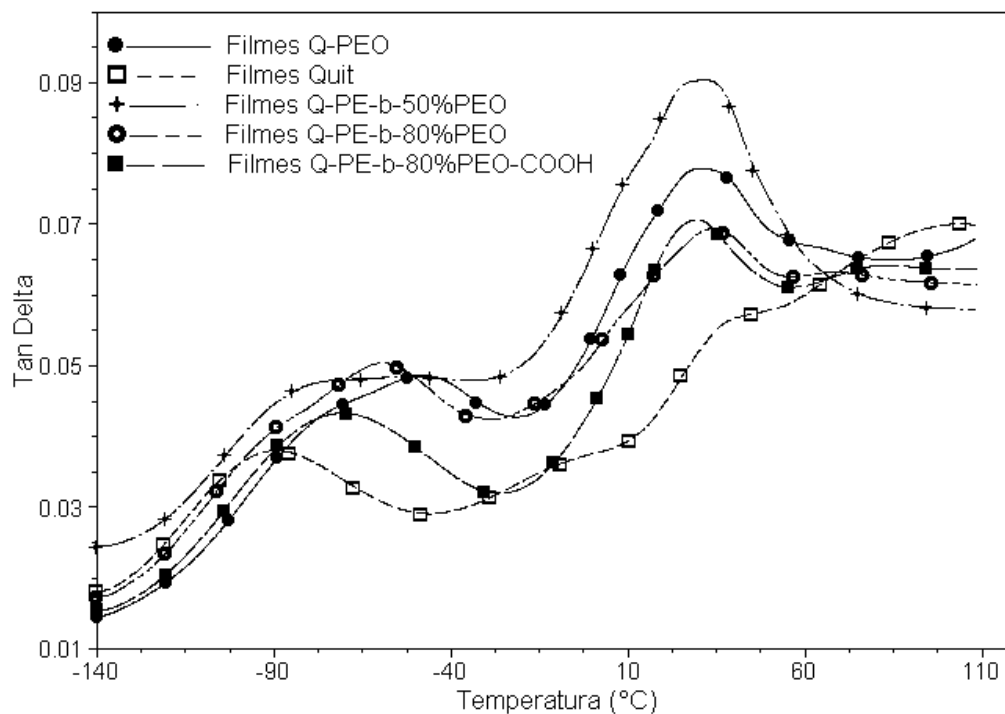


Figura 72-Tangente de delta para quitosana e blendas

Outra diferença é a existência de sinais mais largas nas blendas em relação a quitosana indicativo da maior heterogeneidade dos domínios nas blendas.

O estudo da modificação da quitosana utilizando o PEO e os copolímeros PE-b-PEO permitiram caracterizar estes sistemas como miscíveis, entretanto não mostram diferenças significativas entre estas blendas e a quitosana em relação a suas propriedades de transporte, morfológicas e mecânicas.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS MAGNETICAS A PARTIR DA QUITOSANA OBTIDAS POR *SPRAY DRYING*.

As blendas formuladas e caracterizadas foram utilizadas na formulação das microcápsulas contendo núcleos magnéticos considerando as diferenças encontradas principalmente na cristalinidade dos materiais e o possível impacto das diferenças que introduzem o PEO e os copolímeros no balanço hidrofóbico/hidrofílico da blenda em relação a quitosana.

As microcápsulas produzidas utilizando a técnica de *spray drying* foram preparadas a partir da quitosana e suas blendas com PEO, PE-b-80%PEO, PE-b-80%PEO-COOH nas proporções (80/20)m/m.

As microcápsulas de magnetita (Fe_3O_4) utilizadas foram obtidas utilizando o método da coprecipitação (Yang *et. al.*, 2008). As microcápsulas de magnetita foram sintetizadas a partir de reações de soluções aquosas de 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 hidróxido de amônio em reator.

A obtenção das microcápsulas de quitosana e quitosana modificada foram feitas segundo os parâmetros apresentados na Tabela 7, ressaltando que foi utilizados dois agentes reticulantes para a quitosana, o PEO e seus copolímeros e o TPF. O objetivo foi estabelecer a influência e a contribuição de cada um na modificação das propriedades da quitosana.

Tabela 7 - Parâmetros utilizados na obtenção de microcápsulas de quitosana

Amostras	T_i(°C)	T_s(°C)	Φ(NL/h)	Aspirador(%)	Bomba (mL/min)
Q/ Fe_3O_4	135	90	600	90	15
Q/TPF/ Fe_3O_4	135	87	700	99	15
Q/PEO/ Fe_3O_4	135	88	700	99	13
Q/ PE-b-PEO80/ Fe_3O_4	135	93-95	700	99	11
Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	135	93	700	99	8

4.3.1 – ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.

A Figura 73 mostra as curvas de variação de massa em função da temperatura obtidas através da análise termogravimétrica para as microcápsulas magnéticas (Tabela 8).

Observa-se que a degradação da matriz polimérica ocorre, no mínimo, em dois estágios. O primeiro referente à perda de água retida na matriz, e o segundo, referente à degradação da fase polimérica.

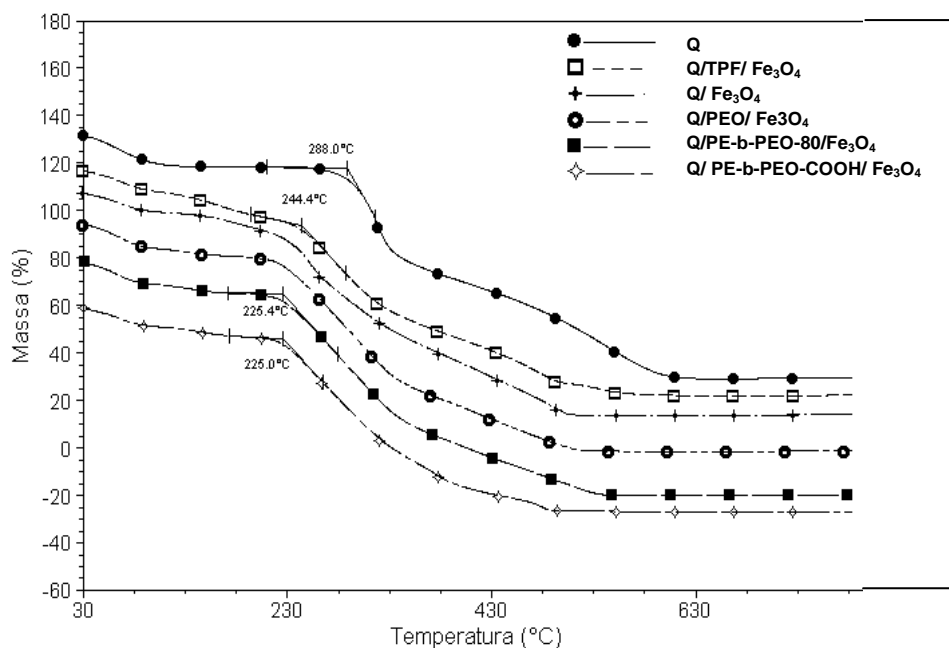


Figura 73- Análises termogravimétricas para as microcápsulas com núcleo de Fe_3O_4 .

O primeiro estágio, esta associado com a perda da água na matriz polimérica, e permite calcular as porcentagens de água retida pela microcápsula (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagem de magnetita e água nas microcápsulas

<i>Microcápsulas</i>	% H_2O	% Nano-Magnetita
Q/TPF/ Fe_3O_4	9,2	7
Q/ Fe_3O_4	8,5	8,2
Q/PEO/ Fe_3O_4	10,2	6,6
Q/PE-b-PEO-80/ Fe_3O_4	9,7	4,2
Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	8,1	16,5

Os valores indicam a existência de uma relação entre o porcentagem de água retida e o conteúdo de PEO e ainda mostra o impacto da modificação do copolímero PE-b-80%PEO-COOH sobre a água retida na matriz. Este resultado esta de acordo com a interpretação dada aos resultados do módulo de perda, DMA, (Figura 74) no que se associa o deslocamento da transição β a interações entre as fases com participação dos grupos hidroxilas.

Em temperaturas superiores (~ 230 °C), observa-se que as microcápsulas, formuladas com as blends, apresentam uma discreta redução da temperatura “onset” do processo de degradação. Esta diminuição no resulta significativa para o

uso previsto como suporte catalítico de um processo que no se realiza a temperaturas tão altas devido a estabilidade das enzimas imobilizadas.

A derivada da curva de variação de massa (DTG) (Figura 74) permitem apreciar com maior detalhe as diferenças entre as blends e a quitosana.

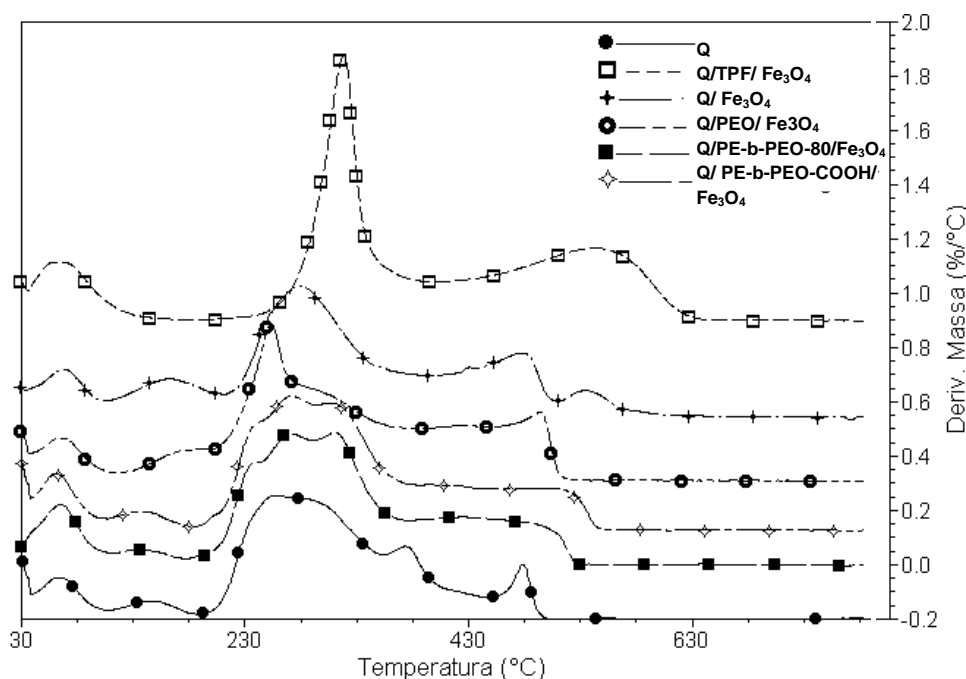


Figura 74 - DTG das microcápsulas de quitosana com núcleo de magnetita.

Em particular destaca-se como a contribuição do PEO modifica o processo de degradação entre 208-400 °C e a presença das terminações carboxílicas na blenda Q-PE-b-80%PEO-COOH.

As cargas das microcápsulas (Tabela 9) determinadas a partir do resíduo registrados nas curvas termogravimétricas (Figura 73) indicam a carga de magnetita que constitui o núcleo das microcápsulas.

Os valores (% carga) encontrados particularmente diferentes nas blends com o copolímero PE-b-80%PEO, esta associado a menor solubilidade desta fase (PE-b-80%PEO) nas soluções preparadas e utilizadas no processo de formulação das microcápsulas pela técnica de *Spray Drying*.

Considerando que este trabalho tem como objetivo obter partículas para utilização como suporte no processo de obtenção de biocombustíveis utilizando reatores assistidos por campo magnético, procura-se comparar as microcápsulas

obtidas pela técnica de *Spray Drying* com as microcápsulas preparadas pela técnica de coagulação que produz partículas maiores com uma provável maior retenção no reator assistido por campo magnético.

4.3.2 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCÁPSULAS PREPARADAS COM A TÉCNICA DE *SPRAY DRYING*.

As microcápsulas de quitosana contendo um núcleo de magnetita apresentam um formato esférico e aspecto superficial enrugado (Figura 75).

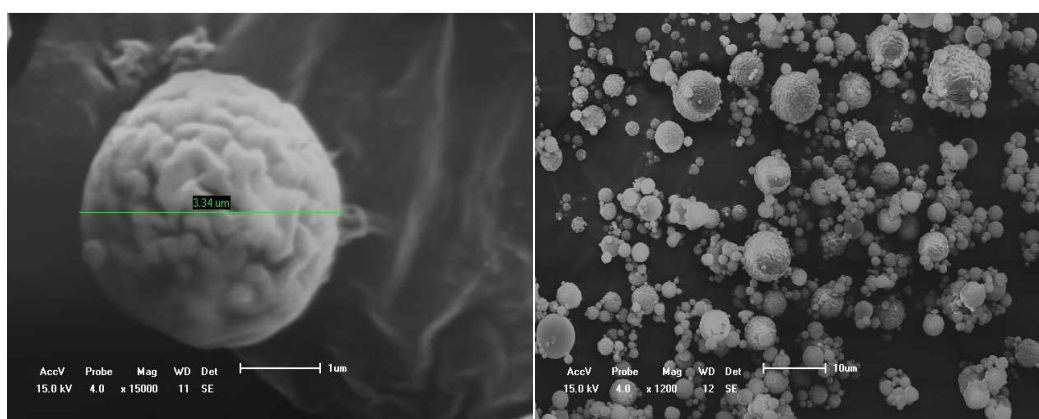


Figura 75 - Micrografia eletrônica de varredura das microcápsulas Q/Fe₃O₄

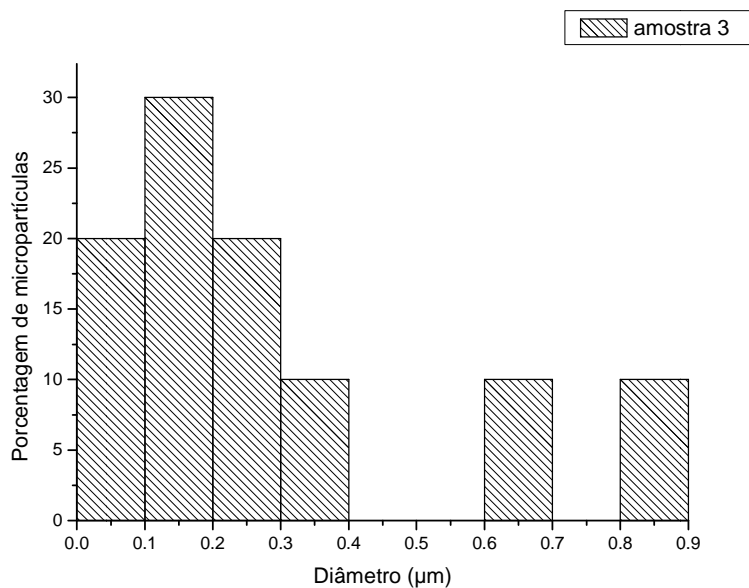


Figura 76 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas – Q/ Fe_3O_4

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 (Figura 76) indica que a maior fração de partículas (29%) das microcápsulas possuem diâmetro médio de 0,15 μm e menos do 20% com diâmetros entre 0,6 - 0,9 μm .

Estas microcápsulas magnéticas são formuladas com o objetivo de imobilizar a enzima covalentemente, entretanto foi avaliada a alternativa de imobilização por encapsulamento e a quitosana foi modificada utilizando trifosfato de sódio, FTP, (Figura 77).

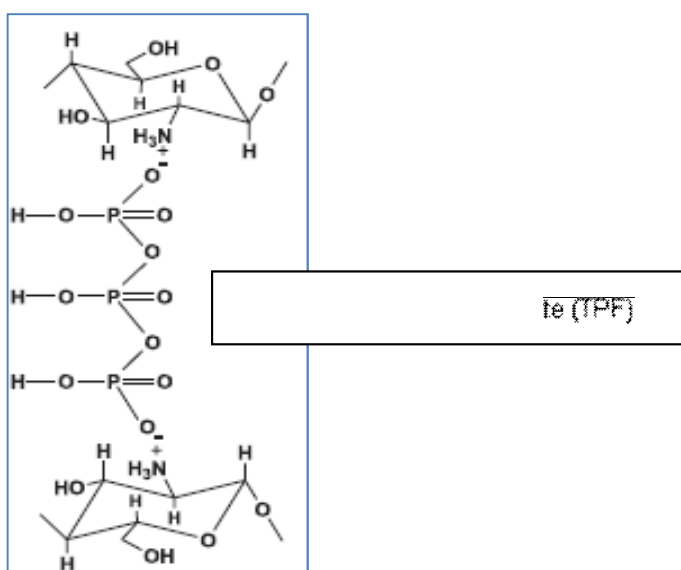


Figura 77 - Modificação da quitosana com trifosfato de sódio (TPF)

As microcápsulas de Q/TPF/ Fe_3O_4 mostrada na Figura 78, apresentaram uma maior rugosidade que as de Q/ Fe_3O_4 e tem formato esférico.

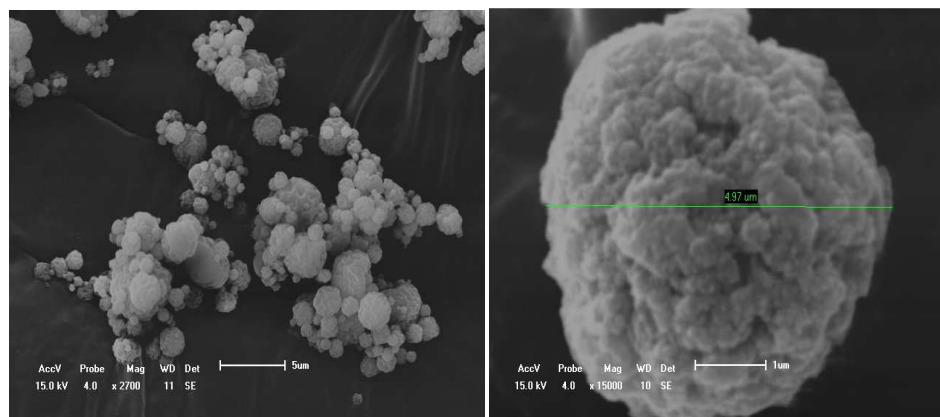


Figura 78- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4 .

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/TPF/ Fe_3O_4 (Figura 79), apresenta-se mais larga que para a Q/ Fe_3O_4 28% das microcápsulas se localizam abaixo de $0,25\mu\text{m}$ e (cerca de 50% em cada faixa) e as restantes entre $0,3$ e $0,55\mu\text{m}$.

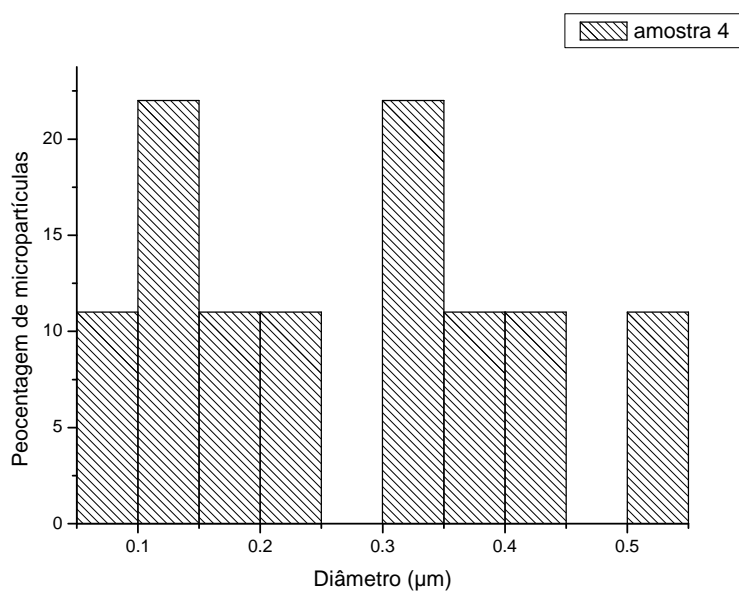


Figura 79 -Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4 .

As microcápsulas formuladas com a blenda Q/PEO (Figura 80) apresentam uma morfologia na que se apreciam ondulações irregulares efeito que pode estar associada com a baixa temperatura de fusão do PEO, inferior a temperatura utilizada no dispersor do *Spray Drier* (135 °C).

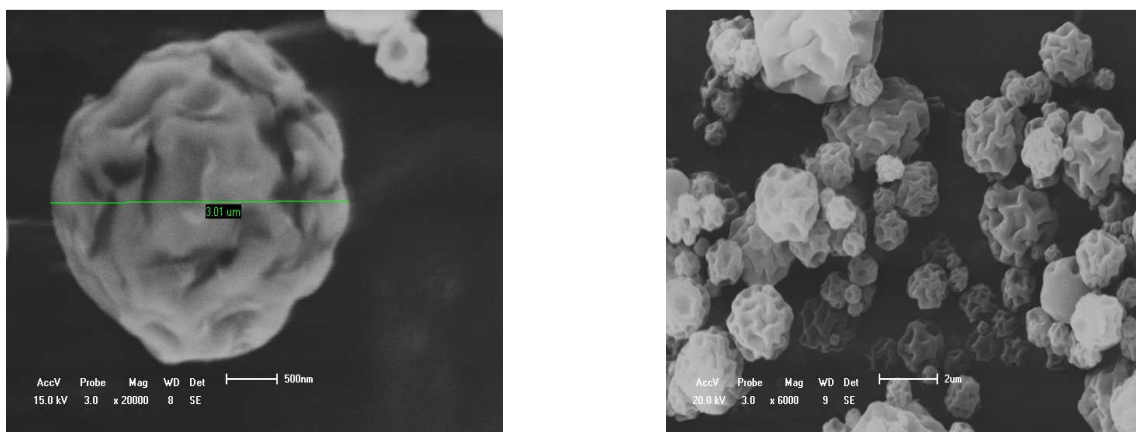


Figura 80 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das micropartículas Q/PEO/Fe₃O₄

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/PEO/ Fe₃O₄ (Figura 81), se caracterizam por uma distribuição diferenciada na que o 60% das microcápsulas se localizam a 0,15, 0,35 e 0,55μm.

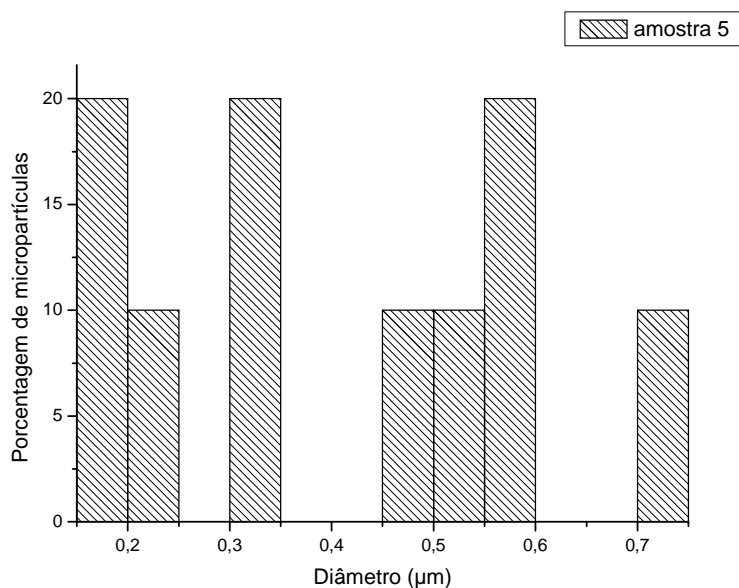


Figura 81-Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/PEO/ Fe₃O₄

As microcápsulas da blenda Q/PE-b-80%PEO (Figura 82) apresentam também uma morfologia na que se apreciam ondulações irregulares o que igualmente associamos a sua baixa temperatura de fusão (54 °C).

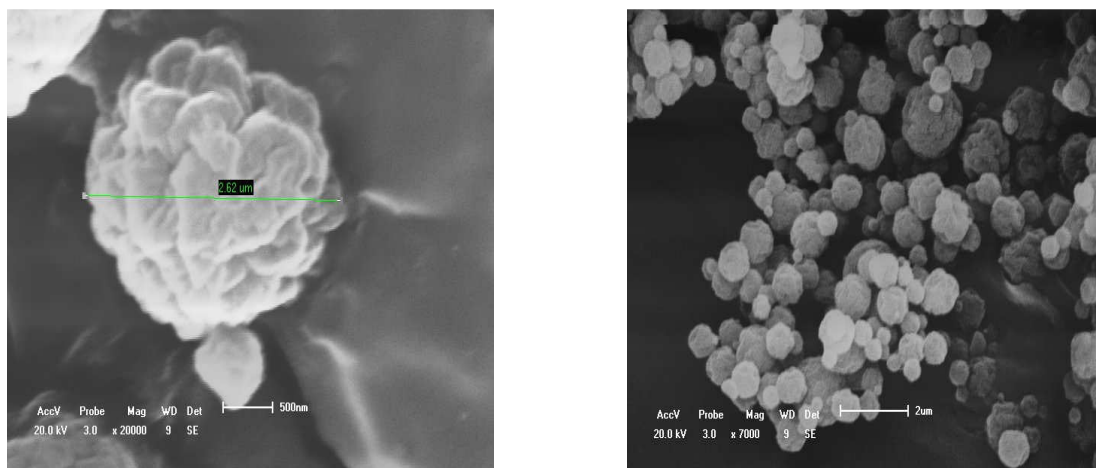


Figura 82- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/Fe₃O₄

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/PE-b-PEO80%/ Fe₃O₄ (Figura 83), apresentam a maior regularidade de tamanho das formulações estudadas, localizando entre 0,1 e 0,4 μm 80% da microcápsulas.

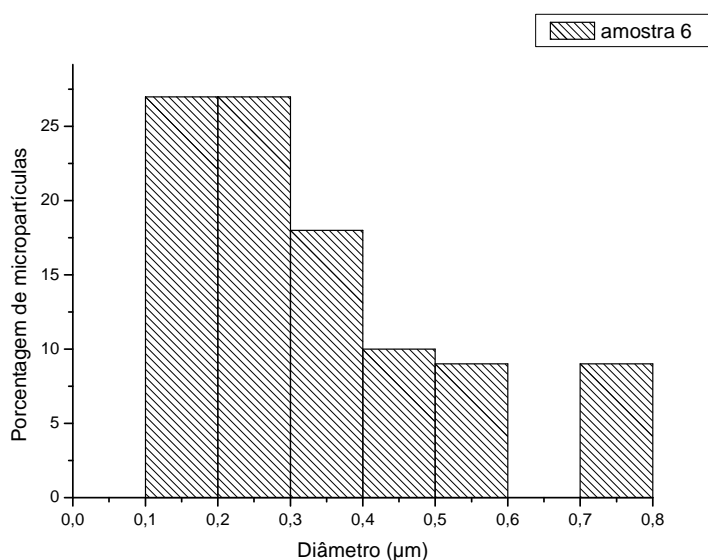


Figura 83 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/Fe₃O₄.

As microcápsulas de Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4 mostrada na Figura 84 apresenta uma rugosidade suave pouco expressiva. Este resultado é coerente com aqueles obtidos com as blendas de Q/ PE-b-PEO-COOH através da microscopia de força atômica, onde a quantidade de PEO adicionada à solução interfere de forma significativa na rugosidade.

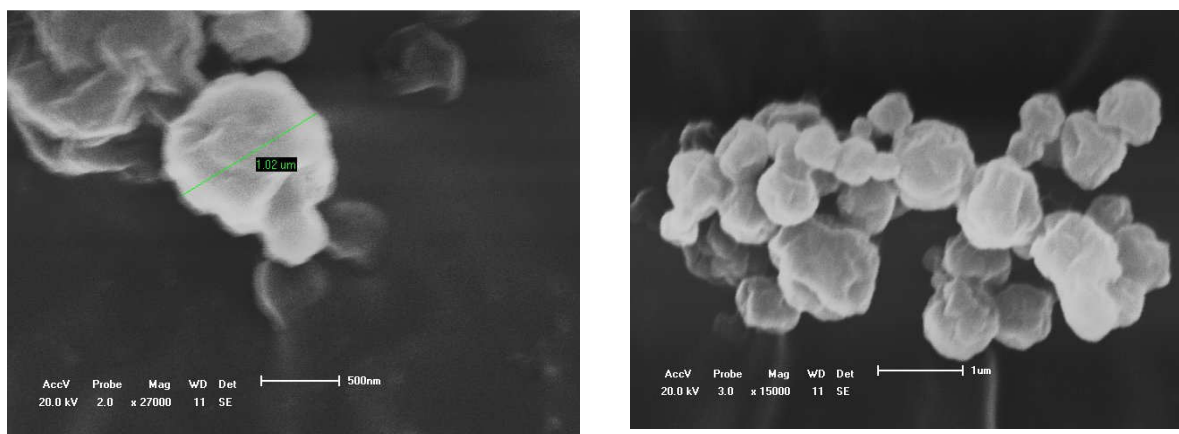


Figura 84 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4

A Figura 85, apresenta o histograma de distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4 , evidenciando que 23% das microcápsulas possuem tamanho de aproximadamente 0,3 μm .

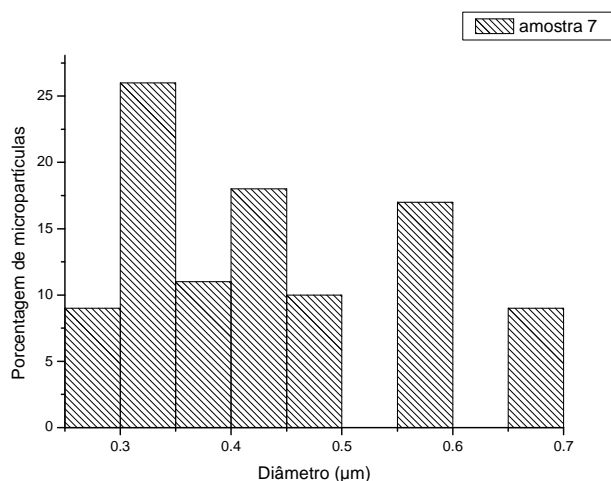


Figura 85 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4

A microcápsulas de Q/TPF/ Fe₃O₄ possuem grande parte da distribuição de tamanho entre 0,3 e 0,55 µm, isto mostra que a adição do TPF como reticulante provocou um aumento na porosidade da quitosana, bem como um possível aumento na área superficial dos poros.

4.3.2 – POROSIDADE

Para a quitosana e suas blendas, a porosidade pode ser influenciada pela rota de preparação e as variáveis dos processos de formulação. Na etapa de preparação, os parâmetros mais importantes foram a concentração da solução de quitosana e a concentração da solução de NaOH (Beppu e Santana, 1999).

Através do método BET para análise de porosidade, foram obtidas as curvas isotermas dos processos de adsorção e dessorção de nitrogênio para as microcápsulas de Q/ Fe₃O₄ os resultados obtidos são apresentados na Figura 86.

Empregando modelos matemáticos associados ao método BET, foram obtidos os dados referentes à isoterma das microcápsulas. Estes dados foram fornecidos pelo software *Quantachrome Corporation* e são relacionados na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados de volume e área superficial para as microcápsulas.

<i>Micropartícula</i>	<i>Área superficial</i>	<i>Volume dos poros</i>	<i>Diâmetro de poro (adsorção)</i>	<i>Diâmetro de poro (dessorção).</i>
Q/ Fe ₃ O ₄	2,3 m ² /g	1,22 x 10 ⁻² cm ³ /g	16,16 Å	18,02 Å
Q-TPF/ Fe ₃ O ₄	3,18 m ² /g	1,65 x 10 ⁻² cm ³ /g	19,49 Å	28,89 Å

Na Figura 86 é apresentado o gráfico com a curva de distribuição de porosidade destas microcápsulas de Q/Fe₃O₄ com propriedades magnéticas. Observa-se que os poros têm sua distribuição em duas regiões distintas, entre 20-50 Å e 50 - 2000 Å.

A partir dos resultados é visto que o tamanho dos poros por adsorção é menor que os poros de dessorção, indicando que o material apresenta rugosidade.

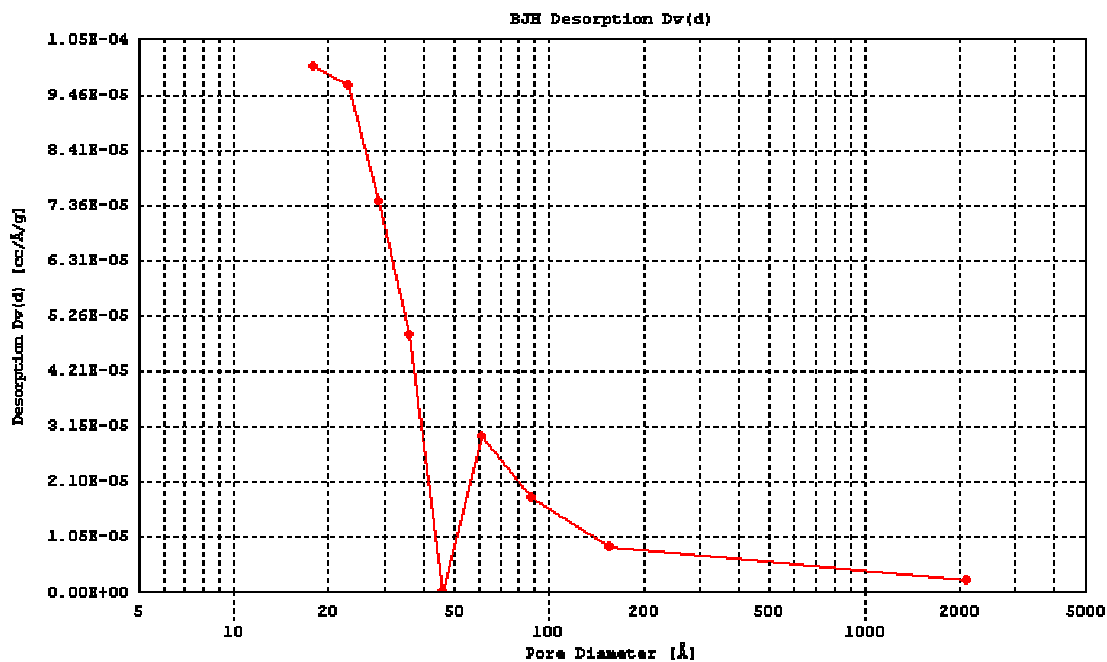


Figura 86 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/Fe₃O₄

Para as microcápsulas de Q/TPF/Fe₃O₄ é possível observar através da Figura 86 uma histerese não significativa entre as curvas de adsorção e dessorção, ou seja, os valores de pressão relativa e volume tiveram pequenas variações, isto acontece com poros pouco arredondados.

A histerese está associada à da morfologia dos poros e a adição de TPF propiciou a mudança na morfologia das microcápsulas tornando a largura da histerese muito próxima de zero.

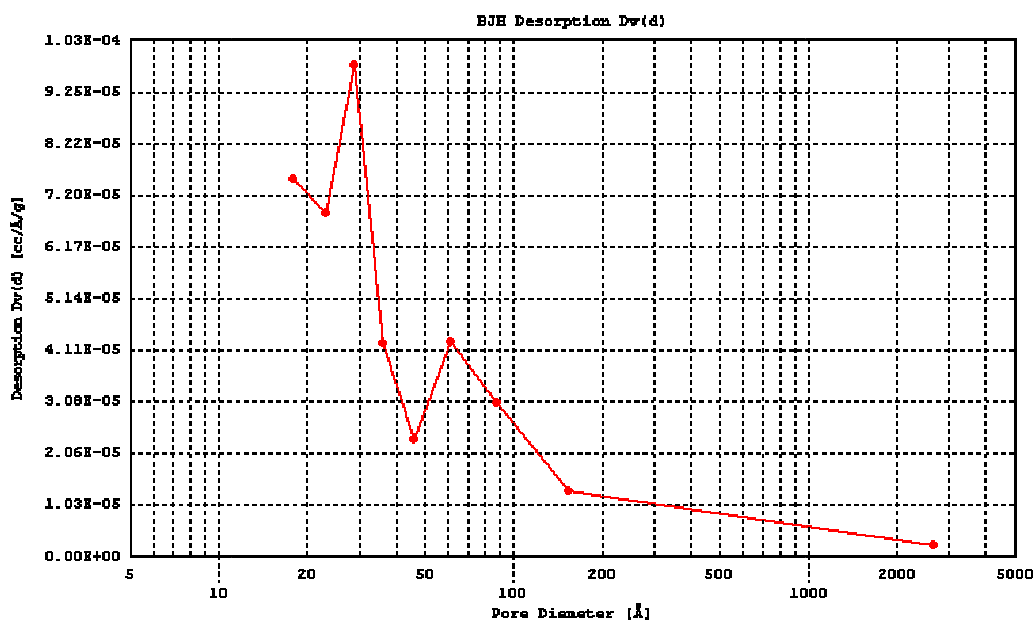


Figura 87 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/TPF/Fe₃O₄

A partir da Tabela 9 pode-se afirmar que para as microcápsulas reticuladas com TPF, houve um aumento significativo no diâmetro dos poros, com destaque para a dessorção indicando que uma quantidade maior de nitrogênio penetrou nas micropátículas, o que significa uma maior rugosidade nas microcápsulas.

A Figura 87 apresenta o gráfico da distribuição de porosidade destas partículas com propriedades magnéticas. Observa-se que os poros tem sua distribuição em duas regiões distintas, entre 18-45 Å e 45 - 2700 Å

Para as microcápsulas de quitosana reticulada com TPF, houve uma mudança na morfologia dos poros, no entanto, houve um aumento na porosidade, uma vez que o volume dos poros por dessorção aumentou consideravelmente em torno de 50% do volume de poros por dessorção para microcápsulas de quitosana pura.

As microcápsulas apresentaram valores elevados de poros de adsorção e dessorção, isto caracteriza o material como rugoso. É importante ressaltar que, dos fatores que podem influenciar na porosidade a modificação química da quitosana com o TPF, foi o fator que modificou a morfologia dos poros.

4.4 – MICROCÁPSULAS MAGNÉTICAS DE QUITOSANA FORMULADAS PELA TÉCNICA DE COAGULAÇÃO

4.4.1 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO.

A quitosana e a blenda de Q/PEO apresentaram maiores diferença em suas propriedades devido isto, estas foram utilizadas para obter as microcápsulas Q/Fe₃O₄ e Q-PEO/Fe₃O₄ (Figura 88) pela técnica de coagulação procurando incorporar uma maior quantidade de magnetita no núcleo das microcápsulas de forma que torne o suporte mais efetivo num processo em reator de campo magnético.

As microcápsulas de quitosana observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 88) apresentaram um formato esférico e uma superfície relativamente lisa quando utilizadas concentrações de quitosana acima de 2% m/m e mais porosa para concentrações de 2%.

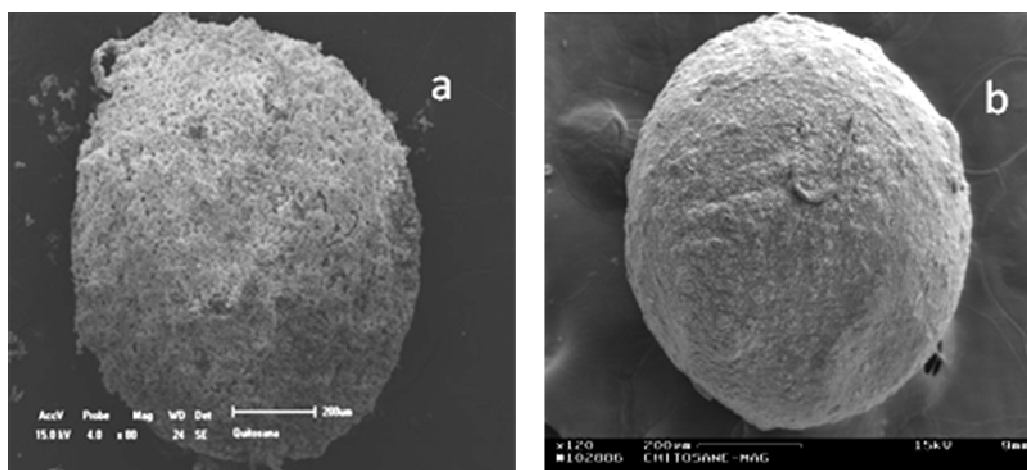


Figura 88 - Microcápsulas de Q/Fe₃O₄ (a) concentração 2% e (b) concentração 3%

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 .

As microcápsulas de Q-PEO/ Fe_3O_4 observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 89) apresentaram um formato mais achatado e uma superfície rugosa quando utilizadas concentrações de quitosana iguais ou superiores a 2% m/m.

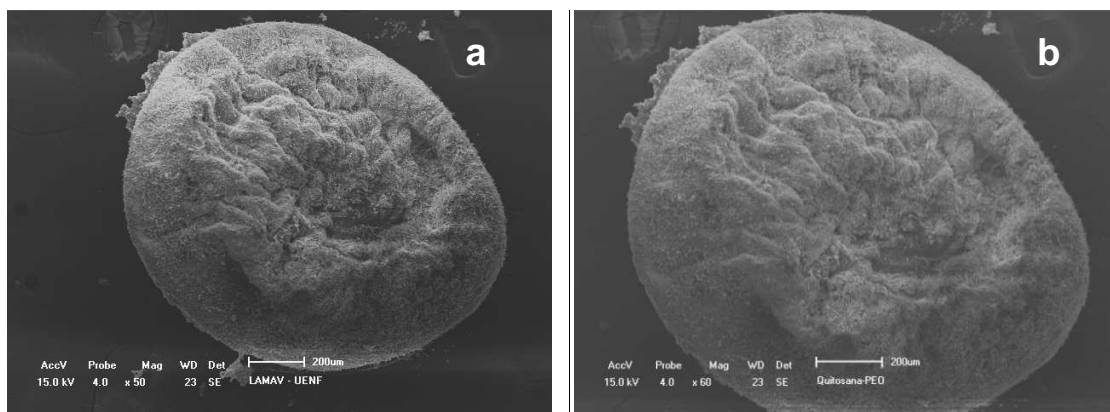


Figura 89 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 /PEO (a) concentração 2% e (b) concentração 3%

4.4.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA E CARGA DE Fe_3O_4 NAS MICROCÁPSULAS.

Com o auxílio da termogravimetria (TGA/DTG) foi analisado o efeito da carga de magnetita na estabilidade da matriz e foi determinada a carga magnética, informação necessária para o análise do comportamento magnético do suporte.

A curvas de TGA/DTG (Figura 90) não indicam mudanças significativas na estabilidade da quitosana.

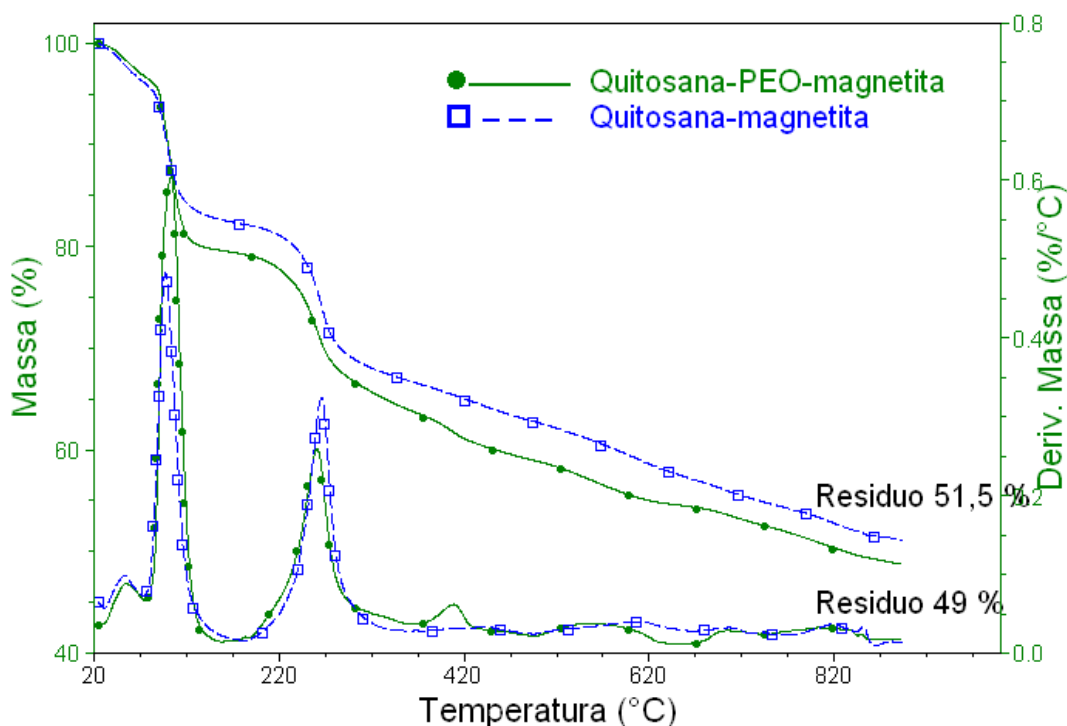


Figura 90 - Curvas termogravimétricas das microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada com PEO.

O comportamento térmico observado para a quitosana se caracteriza basicamente pela presença de um pico a 54°C (5%) e a 96°C (15%) associados a perda da água. A segunda principal perda com taxa máxima a 267°C deve-se a decomposição (térmica e oxidativa), vaporização e eliminação de voláteis da quitosana.

De acordo com a literatura este processo de pirólise dos polissacarídeos se inicia com um processo de quebra randômica das ligações glicosídicas seguida da posterior decomposição com formação de ácido acético e ácidos graxos de baixa massa molar (C2, C3 e C6 principalmente).

As cargas de Fe_3O_4 de 51% e 49% para a quitosana e a blenda com PEO são comparáveis considerando o possível impacto nas propriedades magnéticas destes suportes.

As variações da massa a 54°C são atribuídas à perda de água em decorrência das ligações fracas existentes entre os grupos hidroxilas da água e os grupos amina da quitosana.

Rueda et al, (1999) constataram que a interação da água com os grupos hidroxila são mais fortes do que com os grupos amina e que a perda de água a 94°C esta associada a interação da água com os grupos hidroxilas.

As microcápsulas magnéticas de quitosana modificada com PEO apresentaram picos mais intensos (perdas maiores) na curva de DTG a 94°C o que é de esperar dado que existe uma maior contribuição de grupos hidroxilas na blenda devido a presença da fase PEO, responsáveis pela interação com a água.

4.4.3 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS MICROCAPSULAS DE QUITOSANA E A BLENDAS COM PEO CONTENDO NÚCLEOS DE Fe_3O_4

O estudo da magnetização das microcápsulas (secas) foram realizados por magnetometria

As Figuras 91 e 92 mostram que as amostras apresentaram histerese negligível (próximo de campo zero), indicando um comportamento super paramagnético, e boa magnetização de saturação.

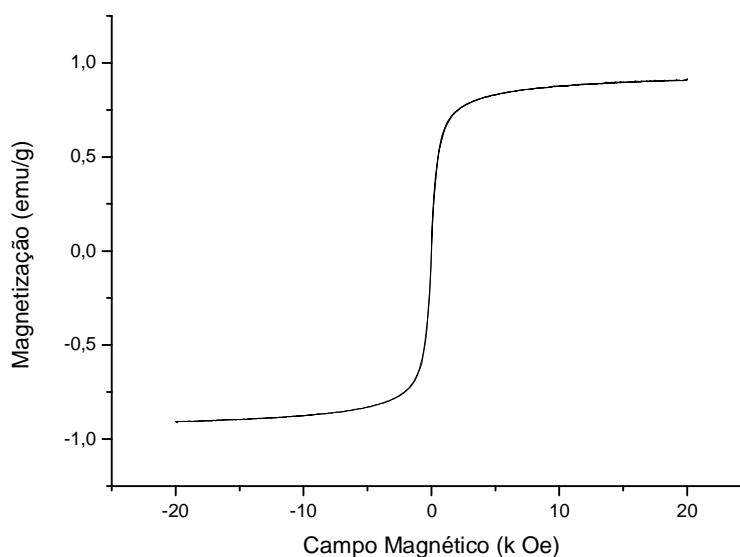


Figura 91 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/ Fe_3O_4

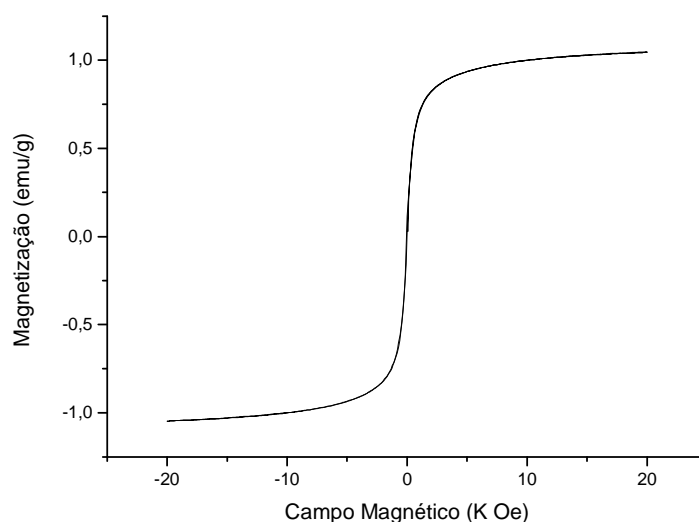


Figura 92 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/PEO/ Fe_3O_4 .

A ausência de histerese evidencia uma baixa coercividade caracterizando 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 ou indução residual. Em outras palavras, o material que foi influenciado pelo campo magnético não permaneceu magnetizado após a retirada do campo magnético.

Outro fato evidenciado pelas medidas magnéticas é que as interações entre as partículas foram pequenas, ou seja, uma partícula não interfere no comportamento magnético da outra.

As microcápsulas de quitosana modificada com PEO e magnetita apresentam maior magnetização de saturação, isto pode ser atribuído à incorporação do polímero nas microcápsulas magnéticas e também ao tamanho das partículas, uma vez que é relatado na literatura que partículas menores apresentam melhores resultados.

4.4.4 - FORMULAÇÃO DE UM BIOCATALISADOR. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA, ATIVIDADE CATALÍTICA.

As enzimas foram immobilizadas utilizando tanto o método de encapsulamento como covalentemente no suporte (Q/Fe₃O₄).

Para a imobilização covalente foi previamente tratado o suporte com uma solução de glutaraldeído. O agrupamento amino foi utilizado para formar uma ligação imínica com o glutaraldeído que a sua vez se liga covalentemente com a Lipase (Figura 93).

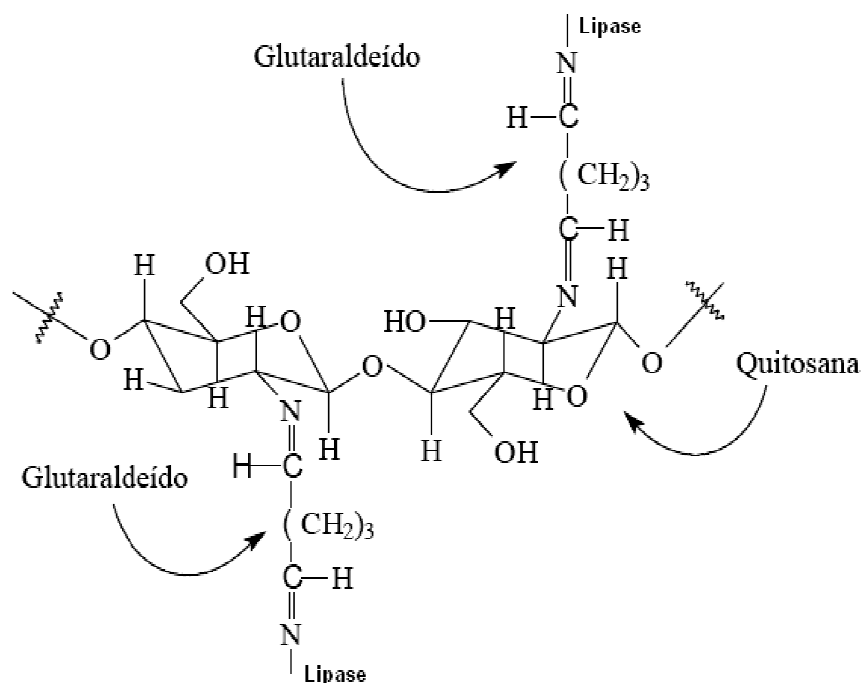


Figura 93 - Imobilização da Lipase no suporte de quitosana (Biochemical Eng. J. v.25, 15-23, 2005).

A imagem de MEV mostra o aspecto dos suportes após a imobilização covalente das enzima Lipase, na que a superfície das microcápsulas se mostram mais densas (Figura 94)

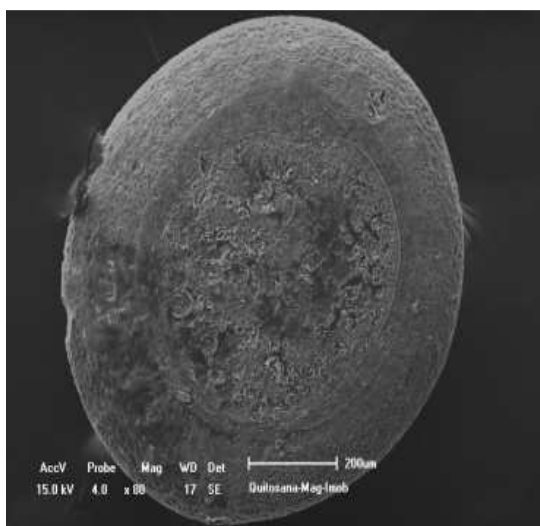


Figura 94 - Morfologia da microcápsula CS-Fe₃O₄-Gt-Lipase.

Resultados preliminares relativos a atividade hidrolítica da enzima (lipase) livre e imobilizada foram medidas utilizando uma emulsão do azeite de oliva, água e goma arábica. A quantidade de ácidos graxos livres liberados durante a hidrólise foi determinada pela titulação com solução de KOH.

A unidade de atividade da lipase (U) definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 mmol de ácido graxo do azeite por minuto nas condições de ensaio são apresentadas na Tabela 10 e 11.

Tabela 10 - Atividade Enzimática por adsorção física

<i>Derivados Imobilizados – adsorção física</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>	<i>Rendimento de Imobilização (%)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	304 U/g	12,45
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	252,7 U/g	10,35

Tabela 11 - Atividade Enzimática por ligação covalente

<i>Derivados Imobilizados – Ligação covalente</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>	<i>Rendimento de Imobilização (%)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	563,16 U/g	25,14
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	630,2 U/g	25,8

Nos suportes que foram imobilizados por adsorção física da Lipase, se observou uma atividade catalítica relativamente baixa para ambos os sistemas. O

menor rendimento do sistema Q-PEO/Fe₃O₄ parece estar associado a que os grupos hidroxilas terminais do PEO interagem na blenda preferencialmente com os grupos da quitosana formando ligações intermoleculares de hidrogênio ou que pode vir a diminuir a capacidade de imobilização do suporte.

A imobilização por adsorção física, em geral, apresenta baixos índices de rendimento por não haver nenhum tipo de ligação química entre suporte e a enzima.

As partículas Q/PEO/ Fe₃O₄ apresentaram uma baixa resistência mecânica e algumas se quebraram durante os tratamentos (agitação) ou que também contribuiu a diminuir o rendimento de imobilização.

A Tabela 12 mostra a atividade enzimática do sistema durante o período de imobilização, observa-se que tanto para as microcápsulas de Q/PEO/ Fe₃O₄ quanto Q/ Fe₃O₄ a diferença não foi significativa devido a uma baixa capacidade de adsorção da enzima ativa.

Tabela 12 - Atividade Enzimática das solução de imobilização durante o período de imobilização

<i>Derivados Imobilizados</i>	<i>Atividade do sobrenadante</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	4 horas	1304
	24 horas	995,6
	Tampão de lavagem	26
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	4 horas	1960
	24 horas	1656
	Tampão de lavagem	54

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- Os filmes de quitosana (80% acetilação) obtidos pela técnica de coagulação (80/20 m/m) apresentam baixa rugosidade (1.3 nm), 56,8 % de cristalinidade, temperatura de fusão em torno a 125°C e um coeficiente de permeabilidade ao vapor da água de $6,44 \times 10^{-7}$ Barrer, $4,89 \times 10^{-7}$ Barrer e $3,32 \times 10^{-7}$ Barrer , para as respectivas temperaturas 50°C, 55°C e 60°C.
- A adição de 20% m/m de PEO e dos copolímeros PE-b-80%PEO e PE-b-80%PEO-COOH à quitosana originou blendas homogêneas, miscíveis (AFM), com uma textura mais irregular e de maior rugosidade (60-93 nm) que o filme da quitosana. A adição do homopolímero e os copolímeros diminuíram a cristalinidade dos filmes em relação ao filme da quitosana (56,8%), principalmente na blenda com o copolímero PE-b-80%PEO-COOH (29% de fase cristalina). A temperatura de fusão da fase cristalina associada a quitosana apresentou uma leve diminuição nas blendas.
- Os filmes das blendas apresentaram permeabilidade inferior (mesma ordem de grandeza) ao filme da quitosana apesar de apresentar uma menor cristalinidade. Este comportamento foi justificado considerando a existência de interações entre os polímeros que formam a blenda o que originou uma modificação na interação do filme com o vapor da água e conseqüentemente no coeficiente de permeabilidade.
- Os filmes preparados com as blendas apresentaram capacidade térmica específica inferior que o filme da quitosana e os valores de difusividade térmica com valores crescentes nas blendas provavelmente associados a existência de domínio de maior mobilidade nas blendas como evidenciado no módulo de perda e na curva de tangente delta registrados nos ensaios de análise dinâmico mecânico.

- Os ensaios dinâmico mecânico (DMA), realizados com os filmes da quitosana e as blendas, mostram uma maior rigidez associada a quitosana a temperaturas acima de 10°C como consequência da formação de fase cristalina. Este fenômeno de cristalização se reduz nas blendas.
- Foram formuladas microcápsulas com a quitosana e as blendas objeto de estudo contendo entre 4-16% m/m de Fe_3O_4 em seu núcleo, utilizando a técnica de *spray drying* as quais apresentaram uma superfície rugosa, forma esférica e uma distribuição de tamanho de partícula entre 0,1-0,9 μm .
- Microcápsulas com a quitosana e a blenda Q/PEO foram formuladas com a técnica de coagulação considerando que estes sistemas apresentaram diferenças relevantes nas propriedades de transporte, rugosidade e cristalinidade entre outras quando formulados os filmes densos. As microcápsulas de quitosana e da blenda com PEO apresentaram um formato esférico com uma maior porosidade nas microcápsulas de quitosana.
- As distribuições de tamanho das microcápsulas são próximas, entre 400-600 μm na quitosana e entre 500-800 μm na blenda, ambas com carga de Fe_3O_4 próxima a 50% m/m.
- As propriedades magnéticas das microcápsulas, tanto para quitosana como para a blenda indicam que os suportes formulados têm uma rápida resposta quando aplicado um campo magnético. Os suportes Q/ Fe_3O_4 e Q/PEO/ Fe_3O_4 não permaneceram magnetizados após retirada do campo magnético. O suporte Q/PEO/ Fe_3O_4 apresentou uma magnetização (1,05 meu/g) maior que o suporte Q/ Fe_3O_4 .
- A imobilização da enzima lipase foi realizada utilizando os suportes Q/ Fe_3O_4 e Q/PEO/ Fe_3O_4 por adsorção física e covalentemente utilizando o glutaraldeído. Os testes preliminares de atividade hidrolítica da enzima indicaram uma maior atividade nas condições de análise para as enzimas imobilizadas covalentemente e quando utilizado o suporte Q/PEO/ Fe_3O_4 .

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCALDE, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A. *Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes*. TRENDS in Biotechnology, n.6, 2006, p.281-287.

ALVES, A. C., Cardoso, J. F., Almeida, M. A. P., Melo, C. K., Louzeiro, H. C. (2005) *Reaproveitamento de lípase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu*. Biodiesel o Novo Combustível do Brasil, 2005, p. 85-89.

AMIJI, M. M. *Permeability and blood compatibility properties of chitosan – poly(ethylene oxide) blend membranes for haemodialyses*. Biomaterials, v.16. p.593-599, 1995.

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

ARCIDIACONO, S.; Kaplan, D.L. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 39, 281 – 286.

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

BORDE, B. et al. *Calorimetric analysis of the structural relaxation in partially hydrated amorphous polyssacarides I Glass transition and fragility*. Carbohydrate Polymers, v.48, p. 83-96, 2002.

BREITENBACH, A. Mohr D., Kissel T., (2000). *Biodegradable Semi-crystalline Comb Polyesters Influence the Microsphere Production by Means of a Supercritical Fluid Extraction Technique (ASES)*. Journal of Controlled Release 63, 53-68.

BRUGNEROTTO. J. et AL. *Na infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization*. Polymer, v.42, p. 3569-3580, 2001.

CAMARGO, F. A. *Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli(3-hidroxibutirato-co-valerato)/(PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar*. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Campinas – SP, Universidade de Campinas – UNICAMP, 2003.

CANEVAROLO Jr., S. V. *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. São Paulo: Artliber, 2002, p.184.

CARVALHO, Tecia Vieira., *Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo* . Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CASTILLO, T. E., *Biossíntese e Caracterização de um Elastômero Biodegradável a partir de Recursos Renováveis*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Tese de Doutorado, 2002, p. 68-70.

CASTRO, N., .A.Witt., A.T.Pires. *Preparação de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas com H₂SO₄ para aplicação como condutores protônicos*. 2008, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

CHANG, J., Xião, B., Chen, Y., Fu, Y., L, P., Wang, X. *Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor*. Energy Conversion and Management, n. 50, 2009, p. 668-673.

CHEN. Xuesi, et al. *Miscibility studies of the blends of chitosan with some cellulose ethers*, Carbohydrate Polymers, 2005, p. 1-7.

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

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

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.

CYPRINANO, G.T.N. Membrans de quitosana macro e microporosa: preparo caracterização e permeabilidade. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. 2008.

DALLAN, Paula Rulf Marreco. *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele*, Tese de Doutorado, UNICAMP – Campinas, São Paulo, 2005.

DONADEL. K , M. D.V. Felisberto, V T. Fávere, M Rigoni, N. J. Batistela, M. C.M. Laranjeira. *Synthesis and characterization of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer*. Materials Science and Engineering C 28 (2008) 509–514.

DUARTE, E. L. *Estudo de Fases Termotrópicas por Microscopia Óptica, Medidas de Densidade, Entálpicas e Espalhamento de Raios X*, Dissertação de Mestrado, USP/IF, São Paulo, 2000.

DUARTE, M. L., et AL. *Na optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy*. Int. J. Biol. Macromol., v31, p. 1-8, 2002.

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

El-Hadi, A., Schanabel, R., Straube, E., Muller, G., Henning, S. *Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. Polym. Test.*, v.21, p.665-674 (2002).

ELIGIO, T. C., Sánchez, R. *Characterization of poly (3-hydroxyalkanoate)s chemically modified and its performance as matrix for hormone release. Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, n. 270, 1999, p. 69-75.

ETTAYEBI, K., Yamani, J. E., Ettayebi, M., Jamai, L. *Production of ethanol from starch by free and immobilized Candida tropicalis in the presence of α -amylase. Bioresource Technology*, n. 98, 2007, p. 2765–2770.

FONTINELES. T.A., Souza.A A., C.M.L.,Silva.Cp., Moita Neto.J.M. *Interação entre polioxido etileno e quitosana.CBQ*, (2006).

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.

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.

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

GILMORE, D. F., Fuller, R. C., Lenz, R., *“Biodegradations of Poly(Beta-Hydroxy Alkanoates), in Degradable Materials: Perspectives, Issues and Oppurtunities, Barenerg, S. A.; Brash, J. L.; Narayan, R., and Redpath, A. E., Eds. CRC Boston,pp. 481-514 (1990).*

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.

GUIMARÃES, A. F. X. S. *Catalisadores heterogéneos para a produção de biodiesel metanólise do Óleo de Soja sobre Hidrotalcites de Magnésio e Alumínio Modificadas*. Tese (Mestrado) – Instituto Superior Técnico Universidade Técnica de Lisboa – IST. 75p. Lisboa, 2007.

HIRANO, S. ; *Biotech. Ann. Res.* 1996, 2, 237 – 258.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/431079>.
[acesado em 10/05/2007](#).

HUANG, S. J., and Edelman, P. G., *An Overview of Biodegradable Polymers and Biodegradation of Polymers, in Degradable Polymers : Principles and Applications.*, Scott, G., and Gilead, D., Eds., Chapman & Hall, Chapter 2, p.18-28, (1995).

IKEJIMA. T., Y. Inoue. *Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(3 – hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan*, Carbohydrate Polymers, 2000,vol. 41, p. 351-356.

ISO, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S. *Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, n. 16, 2001, p. 53–58.

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.

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.

LEITE, H. M. E. *Formulação e Caracterização de Matrizes de Polihidroxibutirato para Liberação Controlada de Fármacos*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Tese de Mestrado, 2004, p.20.

LIMA, I. , Emerson S. Ribeiro e Claudio Airoidi. *O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno*. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 3, 501-506, 2006.

LIMA, Ilauro de Souza. *Quitossanas, quitosana química e quitossanas morfológicamente modificadas com anidrido succínico: propriedades, adsorção e termoquímica.*, Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Campinas – SP, Universidade de Campinas – UNICAMP.

LIU, C., Wang, F., Ou-Yang, F. *Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized Saccharomyces cerevisiae in magnetic particles*. *Bioresource Technology*, n. 100, 2009, p. 878–882.

LOPEZ, F.E, et al. *A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan*. *J.Therm. Anal.Cal.* v.91.p633-639. 2008.

LUCAS, E. F., Soares, B. G., Monteiro, E. *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso molecular e Análise Térmica*, Rio de Janeiro: E-papers, 2001, p. 366.

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

MADDEVER, W. J., and Campbell, P. D., “*Modified Starch Based Environmentally Degradable Plastics,*” in *Degradable Materials: Perspectives, Issues and Opportunities*, Barengerg, S. A.; Brash, J. L.; Narayan, R., and Redpath, A. E., Eds. CRC Boston, pp. 237-262 (1990).

MAJETI, N.V., Kumar R., *A review of chitin and chitosan applications*, *Reactive & Functional Polymers*, 2000, vol.46, p.1-27.

MASSON, J. F., and Manley, R. St. John, "Solid-state NMR of some cellulose/synthetic polymer blends". *Macromolecules.*, v.25,589-592 (1992).

MINTEER, S. D., Cooney, M., Sjöholm, K. H. *Effects of degree of deacetylation on enzyme immobilization in hydrophobically modified chitosan.* Carbohydrate Polymers, n. 77, 2009, p. 420–424.

MURAT, Y. E. *Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres.* Biomateriol, n. 16, 1995, p.157-1161.

MUZZARELLI, R. A. A.; et al. *Polimeri in Medicina*, XX Convegno-Scuola, Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Villa Fetrinelli, 1997, 307 – 336.

NASCIMENTO, M. G., Soldi, V., Dalla-Vecchia, R. *Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros.* Química Nova, v. 4, n. 27, 2004, p. 623-630.

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

NUNES, S. P. e Inoue, T., *Evidence for spinodal decomposition and nucleation and growth mechanisms during membrane formation,* *J. Membrane Sci.*, v.111, p.93-103 (1996).

OLIVEIRA, L. G., Mantovani, S. M. *Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas.* Química Nova, n.3, 2009, p.742-756.

ORNUM, J. V. *Infofish Int.* 1992, 6, 48 – 52.

PARIZE ,A. L. , Hellen K. Stulzer, Mauro C. M. Laranjeira, Inês M. C. Brighente. Tereza C. R. S. Desenvolvimento de Microcápsulas de Quitosana contendo Cúrcuma pelo método de Spray Drying e Reticuladas com Tripolifostato de Sódio.

Anais do 10o Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009

PETER, M. G.; J.M.S. – *Pure Appl. Chem.* 1995, 4, 629 – 640.

POLEY, L. H.D.,(2003) *Aplicações de técnicas fototérmicas ao estudo de propriedades físicas de polímeros biodegradáveis*. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) Campos dos Goytacazes – Rj. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 101p.

POUTON, C. W., Akhtar, S. *Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery*, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v.18; p.133-162 (1996).

PRAPAGDEE. B. et al. *The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by fusarium solani f. SP. Glycines*. *Bioresour Technol.*,v98, p.1353=1358, 2007.

PRASHANTH, K. V. H. ; Tharanathan. R. N. *solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions*. *Carbohydr. Polym*, v.50, p.27-33, 2002.

RAMPIN, M. A., Hurtado, C. R., Dabdoub, M. J. *Síntese de Ésteres etílicos a partir de óleos vegetais utilizando lípase imobilizada de Thermomices lanuginosus*. Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química 29, Àguas de Lindóia-São Paulo, 2006.

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.

RIM, J. W. et AL. *Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity*. *J.Agric. Food Chem.* V54, p.5814-5822.2006.

RITTHIDEJ, G. C., Phaechamud, T., & Koizumi, T. *Moist heat treatment*

on physicochemical change of chitosan salt films. International Journal of Pharmaceutics, 232, 11–22. 2002.

ROY, René., et al. *Chemical Modification of Chitosan. 10. Synthesis of Dendromized Chitosan – Sialic Acid Hybrid Using Convergent Grafting of Preassembled Dendrons Built of Gallic Acid and Tri(ethylene glycol) Backbone,* Macromolecules, 2001, Vol. 34, 3905 – 3909.

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.

SÁNCHEZ, R., Galego N. *Characterization and application of poly- β -hydroxialkanoates family as composite biomaterials.* Polymer Testing, n. 19:485-492.

SÁNCHEZ, R., Galego N. *Physical and functional characterization of PHAscl membranes.* Polymer, n. 43, 2002, p. 3109-3114.

SÁNCHEZ, R., Martin, M., Miguens, F., Rieumont, J. *Morphological study of polymeric microparticles obtained by oil-water emulsion by SEM.* Acta Microscopica, n.6, 1997, p.288.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G. Vargas, H. *Photoacoustic Monitoring of Internal Plastication in Poly (3-hydroxybutirate-co-hydroxyvalerate) Copolymers: Measurements of Thermal Parameters.* Journal Braz Chem Soc, n. 10, 1999, p. 97-103.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G., Sthel, M., Gonçalves, S. S., Schramn, D. U., Briones, J. R., Vargas, H. *Characterization of Poly-3-hydroxy octanoate using Photothermal Methods.* Review of Scientific Instruments, Estados Unidos, n.74, 2003, p.831-833.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G., Vargas, H., Siqueira, M. O., Poley, L. H. *Water and*

vapors permeability at different temperatures of poly-3-hydroxybutyrate dense membranes. *Polímeros - Ciência e Tecnologia*, n.15, 2004, p.22-26.

SASHIWA, Hitoshi, Sei-ichi Aiba. *Chemically modified chitin and chitosan as biomaterial*, *Progress in Polymer Science*, 2004, vol. 29, p.887-908.

SASHIWA, Hitoshi., et al. *Highly Convergent Synthesis of Dendrimed Chitosan – Sialic Acid Hybrid*, *Macromolecules*, 2001, Vol. 34, 3211 – 3214.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa. *Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins*, *Carbohydrate Polymers*, 1999, vol. 39, p. 127-138.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., R. Roy. *Chemical modification of chitosan. Part 9: Reaction of N-carboxyethylchitosan methyl Ester with diamines of acetal ending PAMAM dendrimers*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 47, p. 201-208.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., René Roy. *Chemical modification of chitosan 11: chitosan hybrid as tree like molecule*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 49, p. 195-205.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., René Roy. *Chemical modification of chitosan 8: preparation chitosan - dendrimer hybrid via short spacer*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 47, p. 191-199.

SELLIN, N., (2002) *Análise da Superfície de Polímeros Pós-Tratamento Corona*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) 78p.

SIGNINI, R.e Campana filho, S.P. *Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato*. *Polímeros*, v.11, n.2, São Carlos, 2001.

STROPNIK, C., Germic, L. e Zerjal, B., *Morphology variety and formation mechanisms of polymeric membranes prepared by wet phase inversion*. *J. Appl. Polym. Sci.*, v.61, p.1821-1830(1996).

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

TAN, T., Wang, F., Xie, F., Nie, K., Lu, J. *Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized Candida sp.* 99-125. *Process Biochemistry*, n. 42, 2007, p. 1367–1370.

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

Ullmann'sa Eyclopedia of Industrial Chemistry. 5th Edition, VCH: Germany, v.A16, p.187-258 (1986).

Ullmann'sb Eyclopedia of Industrial Chemistry. 5th Edition, VCH: Germany, v.A21, p.273-304(1986).

UTRACKI, L. A., *Introduction to Polymer Alloys and Blends e Polymer- Polymer Miscibility in "Polymer Alloy and Blends: Thermodynamics and Rheology"*, Hanser Publishers, New York, (1990).

UTRACKI, L.A., *Polymer Alloys and Blends*, Handbook of Polymer Science and Technology, ed. Nicholas P. Cheremisinoff, New York, v.4 p.121-202, (1989).

UTRACKI, L.A., *Polymer Alloys and Blends-Thermodynamics and Rheology*; Munich, Carl Hanser Verlag Publishers, (1989).

VERHOOGT, H., Ramsay, B. A., Favis, B. D. *Polymer Blends containing poly(3-hydroxybutarate)*. *Polymer*, v.35, no 24, p 5155-5169 (1994).

WU, W., Chiou, S., Giridhar, R., Hung, T. *Binary immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 26, 2003, p. 69–78.

XI-Guang Chen, Cheng-Sheng Liu, Chen-Guang Liu, Xiang-Hong Meng, Chong M. Lee, Hyun-Jin Park. *Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial*, *Biochemical Engineering Journal* 2006, vol. 27, p. 269–274.

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.

ZHANG, M.; Li, X.H.; Gong, Y.D.; Zhao, N.M. e Zhang, X.F. *Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG*. *Biomaterials*, v.23, p.2641-2648, 2002.

ZONG, M., Wu, H., Li, N. *Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from Penicillium expansum*. *Process Biochemistry*, n. 44, 2009, p. 685–688.

**MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO
COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Dezembro, 2009**

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

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 Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Dezembro 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

59/2011

Santos, Érica Marques da Silva

Modificação e caracterização da quitosana para uso como suporte em processos biotecnológicos / Érica Marques da Silva Santos. – Campos dos Goytacazes, 2009.

xxi, 171 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, 2009.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodriguez.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos.

Bibliografia: f. 153-164.

1. Quitosana 2. Biotecnologia 3. Microcápsulas magnéticas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

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 Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Comissão Examinadora:

Dsc. Gustavo Wagner de Menezes(Engenharia e Ciências de Materiais) – IFF-RJ

Dsc. Ana Lúcia Diegues Skury(Engenharia e Ciências de Materiais) –
UENF/CCT/LAMAV

Dsc.Tereza Elígio (Engenharia e Ciências de Materiais) – UENF/CCT/LAMAV

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

Dedico este trabalho ao meu filho Gustavo, meu esposo Valdecir e aos meus pais Abelar e Adenir por todo o incentivo, confiança, apoio e carinho durante todo o tempo.

A meu filho Gustavo, como demonstração de amor e prova de que: querer é poder.

A meu esposo, amigo e companheiro por sua confiança, estímulo e apoio em todos os momentos.

A meus pais Abelar e Adenir, que sempre acreditaram em mim. E, me iniciaram no conhecimento e transmitiram a importância do saber e dignidade.

AGRADECIMENTOS

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

“Deus sabe ... Quando estou cansada e desencorajada por esforços que não deram frutos. Deus sabe quando tentei... Quando chorei por longo tempo com o coração cheio de angústia. Ele contou minhas lágrimas. Quando sinto que a vida está perdida e que muito tempo se perdeu Ele me conforta... Quando estou solitária e meus amigos estão muito ocupados para um simples telefonema Ele me acompanha... Quando sinto que já tentei de tudo e não sei por onde remeçar Ele tem a solução... Quando nada mais faz sentido e sinto frustrada e deprimida Ele tenta me mostrar respostas... Quando tudo parece mais brilhante e percebo uma luz de esperança, nesse momento Ele soprou nos meus ouvidos. Quando as coisas vão bem e tenho muito para agradecer Ele está festejando comigo... Quando algo me traz muita alegria e me sinto fortalecida Ele está sorrindo para mim... Quando tenho um propósito a cumprir e um sonho para seguir Ele abre meus olhos e me chama pelo nome... Onde eu estiver seja na alegria e na tristeza, mesmo que ninguém mais saiba, DEUS sabe...”

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

“A verdadeira vida não é constituída de currículos, homenagens ou mesmo conquistas que aumentam o nosso intelecto; mas sim de essência humana. A maior mensagem que posso deixar cravada na minha vida é a maneira pela qual vou vive-la. Minha vida será a sua homenagem.” Minha eterna gratidão!

Ao meu filho Gustavo pela compreensão da minha ausência e pouco tempo para dar-lhe atenção, é uma criança iluminada.

“A você que mesmo tão pequeno se mostrou um gigante, me ensinado que, quem ama não impõe limites ou condições. A você que, em cada despedida, deixava transparecer nos olhos a tristeza, apesar do esforço em esboçar um sorriso consolador. A você que minha eterna gratidão e amor. Você é a luz da minha vida, te Amo!!!

Ao meu esposo Valdecir, pelo carinho, companheirismo, compreensão e apoio, sabendo entender todas as vezes em que tive que ausentar mesmo estando perto.

“A você que esteve comigo todo esse tempo, que sofreu comigo a cada adeus e escutou as histórias mais mirabolantes da minha fase de deslumbramento, ficará eternamente em meus pensamentos e coração. A você, meu amor, que soube suportar com firmeza o tempo e a distância, constituindo um modelo de dedicação e fidelidade. A você que, em cada despedida, deixava transparecer nos olhos a tristeza, apesar dos lábios tentarem esboçar um sorriso consolador, devo a alegria deste momento. Agradeço pelos votos de confiança em mim depositados, que me fizeram crescer e não desistir no meio do caminho.” Amo você!!!

Aos meus pais Abelar, Adenir e meu irmão Éric, minha cunhada Jaqueline e meu sobrinho Lucas, pela paciência, apoio nos momentos difíceis, pelo amor e carinho sempre concedidos.

“A vocês que valorizaram meus sonhos, quando eu mesma não acreditava neles; que me encorajaram a ir mais adiante, quando o medo me fazia hesitar; que me aplaudiram e se emocionaram com cada batalha vencida, os meus mais profundos agradecimentos.

No mérito de minha conquista há muito de suas presenças.

Companhia, sorrisos, palavras e carinho foram expressões de amor profundo e armas desta vitória.

As alegrias de hoje também são suas. Meu carinho e minha gratidão.”

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

Aos professores do Laboratório de Materiais Avançados.

À Luciana Lezira paras análises de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

À Márcia Benzi pelas análises de IFTR, no IMA –UFRJ.

Ao Professor Marcelo Gomes pelas análises de fotoacústica.

À todos os funcionários do Laboratório de Materiais Avançados.

Aos colegas de curso, Camila, Karina pelas análises de permeabilidade, Djalma pelas análises de AFM e apoio na solução de problemas, Álvaro pelo apoio na realização dos experimentos, Paula pela prazerosa convivência.

“A todos vocês que estiveram comigo, nos dias mais anônimos, nas horas simples, a todos os pequenos gestos, as pequenas atenções; a todos que contribuíram para a construção desta vitória, o meu carinho, reconhecimento e gratidão.”

Aos meus amigos, Diego, Bruno, Sarah, Karine e Amanda pela compreensão, apoio e carinho durante todo tempo.

“A vocês que valorizaram meus sonhos, quando eu mesma não acreditava neles; que me encorajaram a ir mais adiante, quando o medo me fazia hesitar; que me aplaudiram e se emocionaram com cada batalha vencida, os meus mais profundos agradecimentos.

No mérito de minha conquista há muito de suas presenças.

Companhia, sorrisos, palavras e carinho foram expressões de amor profundo e armas desta vitória.

As alegrias de hoje também são suas. Meu carinho e minha gratidão.”

À minha prima e irmã, Dulce por estar sempre presente em minha vida, dando a meu filho carinho e amor de mãe e me ajudando a resolver os diversos imprevistos de acontecem.

À Myrian minha amiga e irmã de coração por estar sempre presente, dando ao meu filho todo carinho e amor de mãe.

Em especial à uma grande amiga, Elaine Carvalho pela amizade, companheirismo, hospitalidade e acolhida, estando sempre pronta a me ajudar, sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

“Depois de algum tempo a gente aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.” (William Shakespeare)

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	1
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES:.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	16
1.1-OBJETIVOS:.....	19
1.1.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	19
1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
1.2-JUSTIFICATIVAS:.....	20
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 – POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	21
2.2 - QUITOSANA.....	22
2.3 - FONTES DE QUITINA E QUITOSANA.....	24
2.4- ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITINA E QUITOSANA	25
2.5 – APLICAÇÕES GERAIS DA QUITOSANA	28

2.6 – MISTURAS POLIMÉRICAS	30
2.7 - COMPATIBILIDADE.....	31
2.8 – MISCIBILIDADE	33
2.8.1 - TERMODINÂMICA E MISCIBILIDADE	35
2.8.2 - BLENDS POLIMÉRICAS.....	36
2.8.2.1 - ASPECTOS GERAIS	36
2.8.2.2 - MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE BLENDS POLIMÉRICAS	37
A) BLENDS EM SOLUÇÃO:	37
B) MISTURA MECÂNICA:.....	38
C) MISTURA REATIVA:	38
D) MISTURA DE LÁTEX:	39
E) POLIMERIZAÇÃO <i>IN SITU</i> :.....	39
2.8.3 - MORFOLOGIA DE BLENDS POLIMÉRICAS:.....	39
2.8.4 - APLICAÇÕES GERAIS DE BLENDS POLIMÉRICAS A PARTIR DA QUITOSANA	42
2.9 - BLENDS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM OUTROS POLÍMEROS ...	43
2.9.1 - BLENDS DE POLIHIDROXIBUTIRATO /QUITINA E QUITOSANA.....	43
2.9.2 - BLENDS DE QUITOSANA COM ÉSTERES DE CELULOSE	45
2.9.3 - BLENDS DE QUITOSANA COM CELULOSE	48

2.10 – MATERIAIS MAGNÉTICOS	51
2.10.1 - CURVAS DE MAGNETIZAÇÃO.....	52
2.11 – BIODIESEL	54
2.11.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	55
2.11.2 – PROCESSOS CATALÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL.....	61
2.12 – BIOCATALISADORES	64
2.13 – IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS.....	64
2.14 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO.....	66
- LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE	67
- LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA	68
- ADSORÇÃO.....	68
- CONFINAMENTO EM MATRIZ OU EM CÁPSULAS.....	70
2.15– POLÍMEROS NATURAIS UTILIZADOS COMO SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO.....	74
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
3.1 – MATERIAIS.....	81
3.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA.....	81
3.2.1 – OBTENÇÃO DAS BLENDS POLIMÉRICAS.....	82
3.2.1.1 - PREPARAÇÃO DA QUITOSANA	82

3.2.2 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLIÓXIDO ETILENO.....	83
3.2.3 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLI(ETILENO - CO - ÓXIDO ETILENO) E POLI(ETILENO - CO - ÓXIDO ETILENO) MODIFICADO.....	84
3.3 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E BLENDA.....	85
3.3.1 - CARACTERIZAÇÃO POR FTIV.....	85
3.3.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	86
3.3.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV.....	88
3.3.4- ANÁLISE DE PERMEABILIDADE POR GRAVIMETRIA.....	88
3.3.5 - CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA.....	90
3.3.6 – CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	91
3.3.7 – CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	95
3.4 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA - NÚCLEO.....	97
3.4.1 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMAGNETITA (NÚCLEO).....	97
3.4.2 – PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE <i>SPRAY-DRYING</i>	97
3.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM O NÚCLEO DE NANO-MAGNETITA.....	100
3.5.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	100
3.5.2 – POROSIDADE.....	101

3.5.3 – MEDIDAS DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETÔMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE.....	102
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
4.1 – CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA.....	104
4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QUITOSANA	104
4.1.2 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DE QUITOSANA.....	106
4.1.3 – ESTRUTURA DA QUITOSANA: ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	107
4.1.4 – COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE DA QUITOSANA.....	108
4.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: BLENDS.....	109
4.2.1 – MORFOLOGIA DAS BLENDS.....	109
4.2.2 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA CRISTALINIDADE. .	116
4.2.3 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: INTERAÇÕES ENTRE AS FASES POLIMÉRICAS.....	117
4.2.4 – TRANSPORTE DE MASSA: PERMEABILIDADE	118
4.2.5 – DIFUSIVIDADE TÉRMICA	123
4.1.7 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TÉRMICA	125
4.2.7 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO E MECÂNICO DA QUITOSANA E SUAS BLENDS.	127
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS MAGNÉTICAS A PARTIR DA QUITOSANA OBTIDAS POR <i>SPRAY DRYING</i>	130

4.3.1 – ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.	131
4.3.2 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCÁPSULAS PREPARADAS COM A TECNICA DE <i>SPRAY DRYING</i>	134
4.3.2 – POROSIDADE	140
4.4 – MICROCÁPSULAS MAGNETICAS DE QUITOSANA FORMULADAS PELA TECNICA DE COAGULAÇÃO	143
4.4.1 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO.	143
4.4.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA E CARGA DE Fe_3O_4 NAS MICROCÁPSULAS.	144
4.4.3 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS MICROCAPSULAS DE QUITOSANA E A BLENDAS COM PEO CONTENDO NÚCLEOS DE Fe_3O_4	146
4.4.4 - FORMULAÇÃO DE UM BIOCATALISADOR. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA, ATIVIDADE CATALÍTICA.....	148
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	151
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos polímeros: celulose, quitina e quitosana.	23
Figura 2 - Principal diferença entre as estruturas de celulose, quitina e quitosana.	25
Figura 3 - Representação do arranjo das cadeias poliméricas das quitinas conhecidas: a) α b) β e c) γ	26
Figura 4 - Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica dos polímeros: quitina (NHCOCH ₃), quitosana (NH ₂) e forma modificada (R).	27
Figura 5 - Derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação.	29
Figura 6 – Representação de um sistema de duas fases por DMA.	32
Figura 7 - Diagrama de fases para um sistema binário.	40
Figura 8 - Diagrama de fases para um sistema ternário demonstrando as curvas binodal e spinodal e o ponto crítico.	41
Figura 9 - Difração de raio – x dos filmes de PHB, α -quitina e quitosana, das blendas PHB/ α -quitina e PHB/quitosana: (a) PHB/ α -quitina; (b) PHB/quitosana.	43
Figura 10 - DMTA do PHB, α – quitina, quitosana e as blendas: (a) PHB/ α – quitina; (b) PHB/quitosana.	45
Figura 11 - Difratoformas de CH/HPMC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of HPMC, (b) difratoformas de CH/MC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of MC.	47
Figura 12 - Tensão “ <i>strangth</i> ” da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	48
Figura 13 - Módulo de armazenamento (e’) da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	49
Figura 14 - Módulo “ <i>loss</i> ” (E”) da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	49
Figura 15 - Dependência da temperatura dos valores da Tg δ para a celulose, quitosana e quitosana/celulose.	50
Figura 16 - Representação ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais anti - e ferromagnéticos.	52
Figura 17 - Esquema ilustrativo da movimentação das paredes de domínio de uma amostra desmagnetizada submetida a um campo externo variável.	53
Figura 18 - Representação qualitativa de um ciclo de histerese	53
Figura 19 - Esquema resumida da produção de biodiesel.	54
Figura 20 – TLC de 0 a 72horas da mistura reacional da reação de etanolise do óleo de soja para a produção de biodiesel.	58
Figura 21 – Estabilidade da lipase imobilizada por repetidos ciclos.	59
Figura 22 – 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)	60
Figura 23 – Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento <i>et al.</i> , 2004).	66
Figura 24 – Imobilização de enzimas sobre suporte.	68
Figura 25 – Método de imobilização de enzima por adsorção em um suporte inerte	69
Figura 26 – Representação esquemática da preparação do apoio e imobilização da lipase por adsorção (Xu <i>et. al.</i> , 2007).	70
Figura 27 – Imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento.	71
Figura 28 – Microscopia eletrônica (a) corte transversal (b) superfície, esferas de quitosana a 2,0%(m/v).	72
Figura 29 – Fotos da microscopia da lipase encapsulada com o núcleo líquido no meio rodeado por uma matriz de k-carragenina.	73
Figura 30 – Ilustração esquemática da preparação de aminoácidos modificando esferas de quitosana e imobilização de enzimas	75
Figura 31 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microcápsulas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído.	76
Figura 32 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microcápsulas magnéticas da quitosana (Huang <i>et. al.</i> , 2005).	76

Figura 33 – Microscopia eletrônica quitosana em pó (40 x), (b) FP / QUIT / GLU 0,025 (x 2000), (c) CA / Chit / GLU 0,025 (400 x), e (d) CA / Chit (1000 x) (Foresti et. al., 2007).....	78
Figura 34 – Micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana	79
Figura 35- Esquema ilustrativo do modo de varredura do AFM para a obtenção dos parâmetros de rugosidade	87
Figura 36 - Sistema tipo “copo de Payne” utilizado para medidas de transporte de massa.	89
Figura 37 - Difrátometro marca Shimadzu modelo XRD 7000, utilizado para as análises.	94
Figura 38 - Esquema do microfone de eletreto.....	95
Figura 39 - Processo para formulação das microcápsulas pela técnica de segam por pulverização (<i>spray drying</i>).....	99
Figura 40 - Magnetômetro de Amostra Vibrante marca OXFORD VSM, Modelo 3001 utilizado para as análise.....	103
Figura 41 - Imagens MEV da superfície do filme de quitosana (a) e da seção transversal do filme de quitosana (b).	105
Figura 42- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de quitosana com 20µm x 20µm de área.	105
Figura 43 - Microscopia de força atômica mostrando morfologia da superfície do filme denso de quitosana com 2µm x 2µm de área.	106
Figura 44- Difrátograma do filme de quitosana neutralizado.	106
Figura 45 - Espectro de infravermelho (ATR) da quitosana.	107
Figura 46 - Curva de tempo de retardo para o filme de quitosana utilizando água como permeante a diferentes temperaturas.....	108
Figura 47 – Imagens de MEV: (a) Superfície e (b) Seção transversal no filme de Q/PEO (80/20).	109
Figura 48 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PEO com 20µm x 20µm de área.	110
Figura 49 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PEO com 25µm x 25µm de área.	110
Figura 50- Imagens de MEV: (a) superfície e (b) seção transversal do filme de Q/ PE-B-80%-PEO (80/20).	111
Figura 51 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.	111
Figura 52 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.	112
Figura 53 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-B-50%-PEO (80/20) e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-50%-PEO.	112
Figura 54- Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com 20µm x 20µm de área.	113
Figura 55- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com 20µm x 20µm de área.	113
Figura 56 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-b-PEO-COOH e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-PEO-COOH.	114
Figura 57- Microscopia de força atômica mostrando a topografia do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.....	114
Figura 58 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.....	115
Figura 59 - Difrátograma dos filmes de quitosana pura (a), Q/PE-B-50%-PEO (b), Q/PE-B-80%-PEO (c), Q/PE-B-PEO-COOH (d) e Q/PEO (e).....	116
Figura 60- Espectros de infravermelho (ATR) da quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros PE-PEO.	118
Figura 61- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C	119
Figura 62- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PE-b-80%PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°	119
Figura 63- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a Q/PE-b-80%PEO-COOH nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C	120
Figura 64- Coeficiente de permeabilidade em escala logarítmica versus o inverso da temperatura	122

Figura 65- Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PEO.....	124
Figura 66 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO.	124
Figura 67 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO-COOH.....	125
Figura 68- Evolução da temperatura com o tempo para as blendas.....	126
Figura 69 - Curvas de DSC para os filmes de quitosana e suas blendas.....	127
Figura 70- Módulo de armazenamento (E') para a quitosana e blendas.....	128
Figura 71- Módulo de perda para quitosana e blendas.	129
Figura 72-Tangente de delta para quitosana e blendas	130
Figura 73- Análises termogravimétricas para as microcápsulas com núcleo de Fe_3O_4	132
Figura 74 - DTG das microcápsulas de quitosana com núcleo de magnetita	133
Figura 75 - Micrografia eletrônica de varredura das microcápsulas Q/ Fe_3O_4	134
Figura 76 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas – Q/ Fe_3O_4	135
Figura 77 - Modificação da quitosana com trifosfato de sódio (TPF)	135
Figura 78- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4	136
Figura 79 -Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4	136
Figura 80 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das micropátulas Q/PEO/ Fe_3O_4	137
Figura 81-Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/PEO/ Fe_3O_4	137
Figura 82- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b- PEO80/ Fe_3O_4	138
Figura 83 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/ Fe_3O_4	138
Figura 84 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO- COOH/ Fe_3O_4	139
Figura 85 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	139
Figura 86 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/ Fe_3O_4	141
Figura 87 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/TPF/ Fe_3O_4	142
Figura 88 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 (a) concentração 2% e (b) concentração 3%	143
Figura 89 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 /PEO (a) concentração 2% e (b) concentração 3%	144
Figura 90 - Curvas termogravimétricas das microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada com PEO.	145
Figura 91 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/ Fe_3O_4	146
Figura 92 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/PEO/ Fe_3O_4	147
Figura 93 - Imobilização da Lipase no suporte de quitosana (Biochemical Eng. J. v.25, 15-23, 2005).	148
Figura 94 - Morfologia da microcápsula CS- Fe_3O_4 -Gt-Lipase.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.....	115
Tabela 2 - Cristalinidade das blendas de quitosana.....	117
Tabela 3 - Tabela de coeficientes de permeabilidade das blendas (inéditos não disponíveis na literatura).....	121
Tabela 4 Energias de ativação da permeação a água para as blendas de quitosana.....	123
Tabela 5 - Propriedades térmicas das blendas obtidas através das propriedades fototérmicas	126
Tabela 6 - Temperaturas de fusão da quitosana e suas blendas	128
Tabela 7 - Parâmetros utilizados na obtenção de microcápsulas de quitosana.....	131
Tabela 8 - Porcentagem de magnetita e água nas microcápsulas	132
Tabela 9 - Dados de volume e área superficial para as microcápsulas.	140
Tabela 10 - Atividade Enzimática por adsorção física	149
Tabela 11 - Atividade Enzimática por ligação covalente	149
Tabela 12 - Atividade Enzimática das solução de imobilização durante o período de imobilização	150

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIAÇÕES:

CH - Quitosana

AC – Acetato de celulose

AAc – Àcido acrílico

TPF – Tripolifosfato de pentasódio

PGA – poli-ácido glicólico

PLA – poli-ácido láctico

PCL – policaprolactona

PVA – poli-álcool vinílico

PEO- polioxido de etileno

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

DTG – Termogravimetria derivativa

CAP – propionato acetato de celulose

FTIV – Espectroscopia de infravermelho com transformado de fourier

CAB – butirato acetato de celulose

CO₂ – Dióxido de carbono

NH₂ – Amina primária

ΔG_m – energia livre de mistura

ΔH_m – entalpia de mistura

ΔS_m – entropia de mistura

GA – Grau de Acetilação

MM – Massa Molar

N₂ – Nitrogênio

RMN – Ressonância magnética nuclear

T_c – Temperatura de cristalização

T_g – Temperatura de transição vítrea

TG – Termogravimetria

TGA – Análise termogravimétrica

HCl – Ácido Clorídrico

T_m – Temperatura de fusão

ΔT – Variação de temperatura

PAMAM – Poliamidoamina

NaOH – Hidróxido de Sódio

MeOH – Metanol

Da - Dalton

GPC – Cromatografia de permeação em gel

M_v – Massa molar viscosimétrica

RESUMO

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. O biodiesel surge como uma alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, já que sua utilização pode garantir a segurança energética, a diminuição da poluição do ar, além de ser uma energia renovável.

Recentes pesquisas buscam produzir o biodiesel de forma sustentável e economicamente viável. Os estudos dão ênfase ao processo de biocatálise como forma de baixar os custos da produção de biodiesel.

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento do setor biotecnológico no Brasil, encontra-se o estudo de novos biocatalisadores com propriedades magnéticas utilizando diferentes polímeros de origem natural como suporte de enzimas a serem utilizados no processo de produção de bicompostíveis. Assim a quitosana, segundo polímero natural encontrado em maior quantidade na natureza, foi caracterizada e modificada fisicamente e quimicamente com o objetivo de avaliar seu potencial como suporte magnético da enzima Lipase a ser utilizada num reator assistido por campo magnético.

Foi modificada a quitosana pela adição do homopolímero polióxido de etileno (PEO) e os copolímeros PE-b-x%PEO contendo 50 e 80% do co-monômero PEO sem modificar e 80%PEO modificado parcialmente (PE-b-80%PEO-COOH). Ainda foi utilizado o trifosfato de sódio (TPF) para realizar a modificação química da quitosana.

Os filmes densos da quitosana, sem modificar e modificada, foram preparados pela técnica de *casting* e caracterizados utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FITV), análise dinâmico mecânico (DMA), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e determinada as propriedades de transporte destes materiais pelas técnicas gravimétrica e fotoacústica. Os resultados mais significativos indicaram a diminuição da cristalinidade da quitosana quando modificada com o PEO e seus copolímeros na

proporção 80/20 m/m, a formação de misturas homogêneas e diminuição do coeficiente de solubilidade (H) do vapor de água.

Os suportes a partir da quitosana e suas blends foram preparados utilizando as técnicas de *spray drying* e coagulação. As diferentes microcápsulas foram caracterizadas em termos de distribuição de tamanho, porosidade, morfologia e carga magnética.

As microcápsulas formuladas pela técnica de coagulação com a quitosana e a blenda Q/PEO (80/20 m/m) apresentaram a maior carga magnética (~50% m/m) de Fe_3O_4 e um comportamento magnético com uma reversibilidade elevada e não houve indução residual, sendo as microcápsulas de Q/PEO as que apresentaram a maior magnetização de saturação.

Os biocatalisadores foram formulados utilizando as metodologias de adsorção e de imobilização covalente da enzima Lipase K tanto no suporte de quitosana como da blenda Q/PEO.

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 e particularmente quando utilizado como suporte a blenda Q/PEO.

ABSTRACT

The growing concern over global warming at the beginning of the XXI century encourages discussions of new energy sources. Biodiesel is an alternative to petroleum based diesel and its derivatives its use can ensure less expensive energy and reducing air pollution, Moreover, biodiesel is a renewable type of energy.

Recent research works are seeking to produce biodiesel in a sustainable and economically viable manner. Studies emphasize the process of catalysis as a way to lower the cost of biodiesel production.

Among the prospects for development of the biotechnology sector in Brazil, the study of new biocatalysts with magnetic properties is a priority. In the case different polymers of natural origin as a support for enzymes are used in the production of biofuels. Thus chitosan, a natural polymer found as the second largest amount in nature, was characterized physically and chemically modified in order to evaluate its potential as a magnetic medium of the enzyme lipase to be used in a reactor assisted by magnetic field.

Chitosan was modified by the addition of polióxido ethylene homopolymer (PEO) and PE-b-x%PEO copolymers containing 50% PEO and 80% of co-monomer PEO and 80% partially modified PEO (PE-b-PEO-COOH 80%). It was also used the sodium triphosphate (TPF) to perform chemical modification of the chitosan.

The dense films of both pure and partially modified chitosan, were prepared by casting technique and characterized using the techniques of scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), dynamic mechanical analysis (DMA), and differential scanning calorimetry (DSC). The transport properties of these materials were determined by gravimetric and photoacoustic techniques. The most significant results indicated a decrease in crystallinity of the chitosan when modified with PEO and its copolymers in proportion 80/20 w / w. The formed mixtures were homogeneous and presented decreased solubility coefficient (H) of water vapor.

The supports from chitosan and its blends were prepared using both the spray drying and coagulation technique. The different microcapsules were characterized in terms of size distribution, porosity, morphology and magnetic charge.

The microcapsules made by the coagulation technique with chitosan blend and Q / PEO (80/20 w / w) showed the greatest magnetic charge (~ 50% w / w). It

also presented a Fe_3O_4 magnetic behavior with a high reversibility and no residual induction, The microcapsules Q / PEO were those that had the highest saturation magnetization.

The biocatalysts were formulated using the methods of adsorption and covalent immobilization of the enzyme Lipase K both in support of the blend of chitosan as Q / PEO.

The catalytic tests, carried out in a preliminary way using an emulsion of oil, water and gum Arabic, showed a higher catalytic activity for the covalently immobilized enzyme this was particularly the situation when used as support for blend Q / PEO.

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. Em todo o mundo já se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, que causariam um impacto muito menor no aquecimento do planeta (Gonçalves et. al., 2005). O biodiesel ganhou importância pela sua capacidade de substituir os combustíveis fósseis (Muthu, 2008).

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

Recentes pesquisas buscam produzir o biodiesel de forma sustentável e economicamente viável. Os estudos dão ênfase ao processo de biocatálise como forma de baixar os custos da produção de biodiesel.

O uso de enzimas como catalisadores da reação de transesterificação para produção de Biodiesel, tem se tornado uma opção bastante atrativa, devido a especificidade das enzimas e dos benefícios ambientais e econômicos decorrentes da utilização deste biocombustível.

O desenvolvimento de novas técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (Nascimento et. al., 2004).

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 (Nascimento et. al., 2004).

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (Nascimento et. al., 2004).

Polímeros naturais têm sido utilizados para imobilização de enzimas em vários estudos (Murat, 1995). Polissacarídeos representam o grupo mais utilizado entre eles, por contribuir para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um micro-ambiente favorável e mantendo dessa forma, a atividade enzimática (Nascimento et al., 2007).

A quitosana vêm sendo estuda e aplicada no processo de imobilização de enzimas, uma vez que possui características interessantes para sua utilização como: biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade.

Microcápsulas de quitosana vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de melhorar suas propriedades de adsorção. A versatilidade deste polímero permite a preparação de microcápsulas de diferentes formas e tamanhos, envolvendo diversos produtos e derivados. O uso de quitosana porosa em partículas apresenta inúmeras vantagens no processo de imobilização de enzimas.

O presente trabalho tem como objetivo a formulação e caracterização de microcápsulas magnéticas de quitosana para atuarem como suporte em processos de produção de biodiesel.

Foram formuladas microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada e, estas foram caracterizadas utilizando diversas técnicas de análise, quantitativa, qualitativas e morfológicas.

1.1-OBJETIVOS:

1.1.1 - OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Promover a modificação da quitosana procurando novas propriedades.
- ✓ Formulação e caracterização de filmes densos a partir de quitosana modificada com potencial uso biotecnológico.
- ✓ Formulação e caracterização de microcápsulas com núcleo magnético para uso na área biotecnológica.

1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Formular e caracterizar blendas das quitosanas procurando modificar cristalinidade e hidrofiliidade preservando a funcionalidade NH.
- ✓ Formular e caracterizar microcápsulas contendo como núcleo nanomagnetita e uma superfície irregular que propicie a imobilização de enzimas e células para a produção de biodiesel.

1.2-JUSTIFICATIVAS:

O desenvolvimento de novos materiais que possuam propriedades específicas e que por sua vez contribuam ao desenvolvimento sustentável é o foco principal na atualidade de cientistas e ambientalistas.

Assim a utilização de polímeros naturais como a quitina e seu derivado a quitosana obtido a partir da desacetilação, vem sendo objeto de estudo, para sua aplicação em diversas áreas. Embora possa ser sintetizada é considerado um polímero natural, tendo em vista que sua principal fonte de obtenção é a quitina, que por sua vez é um dos polissacarídeos naturais mas abundantes na natureza, perdendo apenas para a celulose.

A utilização da quitosana para o desenvolvimento de novos materiais se torna atrativa no sentido de que a quitosana pode ser obtida a partir de recursos renováveis, como a partir da carapaça de crustáceos de onde se obtém a quitina que depois de processada se transforma em quitosana.

A produção de quitina tem aumentado de forma considerável no Brasil, isto viabiliza seu uso

Além desta vantagem a quitosana apresenta baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade entre outras propriedades que permitem sua utilização na área biotecnológica.

Por outro lado existe uma crescente preocupação com a necessidade de um desenvolvimento sustentável o que tem sido um incentivo adicional a pesquisa científica, principalmente no Brasil, no sentido de utilizar combustíveis renováveis, como o biodiesel, sendo uma alternativa para substituição de combustível fósseis e preservação do meio ambiente.

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

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Os polímeros biodegradáveis são classificados em duas categorias, baseada na fonte de obtenção; ou seja, rotas sintéticas ou naturais, incluindo plantas e microrganismos.

A primeira consiste de polímeros sintéticos obtidos em laboratório, onde grupos susceptíveis ao ataque enzimático são previamente programados para fazer parte de sua estrutura, como no caso dos poliésteres alifáticos. Estes são facilmente biodegradados e vários exemplos já são conhecidos e utilizados, tais como o poli-ácido glicólico (PGA), o poli-ácido láctico (PLA), copolímeros do PLA/PGA e a policaprolactona (PCL).

Outros polímeros sintéticos também conhecidos como susceptíveis à biodegradação são o poli-álcool vinílico (PVA) e o poli-óxido de etileno (PEO) (Verhoogt, 1994).

A segunda rota de obtenção de polímeros biodegradáveis é a natural, onde estão contidos alguns microrganismos e plantas. Dentre as plantas podemos citar a celulose e o amido que existem em grande abundância na Terra e são bem conhecidos pelo homem. Entretanto, outras fontes naturais, como os microrganismos, têm se revelado promissoras.

A biodegradação de polímeros ocorre geralmente por hidrólise e oxidação. Vários fatores como a presença na cadeia principal de determinados grupos funcionais, ligações hidrolisáveis e/ou oxidáveis, natureza dos substituintes, estereo configuração, grau de hidrofobicidade ou hidrofiliidade, e flexibilidades conformacional influenciam a biodegradabilidade dos polímeros (Huang e col., 1995).

É importante chamar a atenção sobre o processamento de polímeros naturais, tais como celulose e amido. Como a celulose possui uma alta somatória de energia de interação, por pontes de hidrogênio entre as cadeias, ela não dissolve em solventes comuns e degrada antes de sofrer a fusão como outros termoplásticos convencionais. Assim, ela deve passar por modificação estrutural, como a introdução de grupos laterais na cadeia, de modo a diminuir esta alta energia de interação e ser

processada. Exemplos disso são os ésteres de celulose, que podem ser processados como um polímero termoplástico, uma vez que a temperatura de fusão foi reduzida significativamente abaixo do ponto de degradação devido a introdução dos grupos ésteres na cadeia. Semelhante à celulose, o amido deve ser modificado antes de ser processado, porém deve-se ter cuidado para que sua modificação não coloque em risco seu grau de biodegradação (Maddever,1990).

2.2 - QUITOSANA

A quitosana é obtida da quitina que é um polissacarídeo natural muito importante. Considerando a quantidade de quitina produzida anualmente no mundo, é o maior polímero em abundância após a celulose. A quitina é sintetizada por um número enorme de organismos vivos e é encontrada principalmente, no exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo e lagosta.

O derivado mais importante da quitina é a quitosana, obtida pela desacetilação da quitina. A quitosana é um produto natural não-tóxico e, devido à presença dos grupos $-NH_2$ e $-OH$ na estrutura do polímero, possui características que lhe conferem uma ampla aplicação.

Atualmente a quitosana vem sendo utilizada no tratamento de águas, produção de cosméticos, drogas e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semi permeáveis e no desenvolvimento de biomateriais. Na presença de soluções diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, constituído de um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose de composição variável em função do grau médio de acetilação, GA , que representa a fração de unidades e é um dos principais parâmetros para sua caracterização.

As estruturas da celulose, da quitina e da quitosana são mostrada na Figura1.

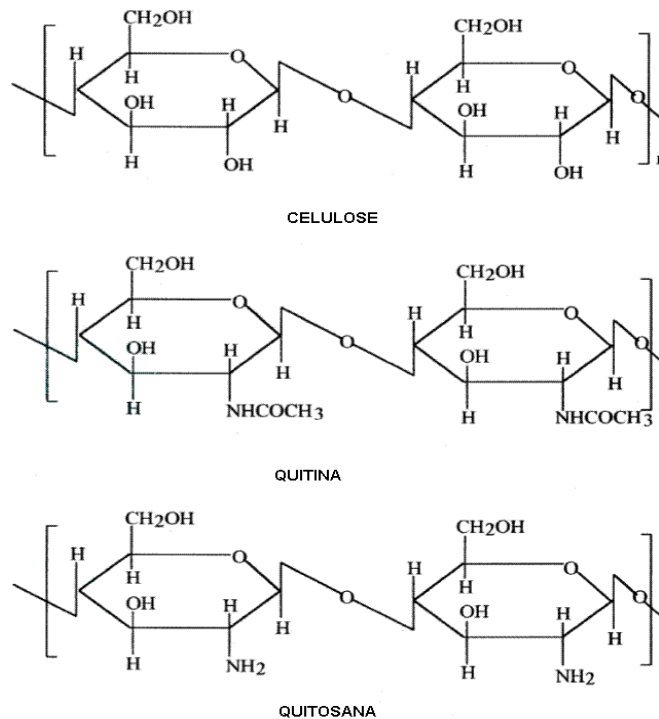


Figura 1 – Estrutura dos polímeros: celulose, quitina e quitosana.

Atualmente os polímeros naturais tais como a celulose, quitina e quitosana e seus derivados possuem maior degradabilidade e biocompatibilidade, quando comparados com a maioria dos polímeros sintéticos encontrados nos dias de hoje.

Entretanto, estes materiais naturalmente abundantes exibem limitações em relação à reatividade e processabilidade. A quitina e a quitosana são indicadas como materiais funcionais apropriados, por possuírem propriedades excelentes, tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade e propriedades de adsorção, entre outras.

Recentemente, muita atenção foi dada a quitosana com um polissacarídeo em potencial. No entanto, embora tenha sido feito grandes esforços com a finalidade de preparar derivados funcionais da quitosana, através de modificações químicas, poucos foram os sucessos alcançados, com relação a solubilidade em solventes orgânicos em geral e em alguns sistemas de solvente binários. A quitina e a quitosana quimicamente modificadas têm como resultado uma melhora na solubilidade com relação a solventes orgânicos em geral.

2.3 - FONTES DE QUITINA E QUITOSANA

Quitina e quitosana são biossintetizados e biodegradados na biosfera terrestre. Com estimativa anual de 100 bilhões de toneladas por ano, bem distribuídos na natureza sem haver um excesso de acúmulo.

A quitina é um dos materiais orgânico mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Por outro lado, a quitosana não é muito encontrada como material natural em si, quando comparada à quitina e à celulose, ocorrendo muito dispersamente em alguns microorganismos. Por isso, devido à baixa ocorrência natural, a quitosana é normalmente obtida por desacetilação da quitina natural. Contudo, a quitosana assim obtida ainda é considerada como um biopolímero natural.

A quitina é amplamente distribuída na natureza, sendo maior componente estrutural do exoesqueleto dos invertebrados marinhos, cuja quantidade relativa varia de 30 a 60% nos crustáceos (cuja a quantidade relativa varia de 30 a 60%) nos crustáceos) e da cutícula dos insetos, como também é encontrada na parede celular de alguns fungos e leveduras.

A quitina funciona como um componente fibroso na estrutura do exoesqueleto, cutícula e parede celular dos organismos nos quais ocorre. Desta maneira, ela é quase sempre encontrada associada às proteínas, formando oligoproteínas que funcionam como matrizes que interagem com outros constituintes, como os taninos fenólicos na cutícula dos insetos e os minerais no exoesqueleto dos crustáceos.

Embora esteja bastante difundida na natureza, no momento a fonte economicamente mais viável para a obtenção da quitina, e conseqüentemente da quitosana, tem sido os refugos industriais do processamento de crustáceos, destacando-se entre eles, já em larga escala, os caranguejos, camarões e lagostas.

Devido ao aumento acelerado o interesse científico principalmente industrial em quitina e quitosana, outras fontes destes materiais foram avaliadas como, por exemplo, extração de quitina do fungo utilizado na produção do ácido cítrico. (referencia). Os investigadores acreditam que nos futuros os microorganismos serão uma das principais fontes de quitina e quitosana.

Entretanto, estas e outras novas fontes testadas ainda não têm demonstrado viabilidade econômica, devido ao alto custo, além de problemas técnicos e científicos, encarecendo o produto final. Contudo, as fontes naturais no momento são basicamente os resíduos de crustáceos, que ainda mostram suficiência no suprimento da demanda mundial.

Entretanto, para evitar problemas futuros, até mesmo de ordem bioecológica, cada vez mais crescem as investigações em busca de novas fontes e tecnologias adequadas para obtenção de quitina e de quitosana.

2.4- ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um biopolímero de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-amino-dioxi-D-glicopiranosose, unidades interligadas por ligações glicosídicas (1 → 4) glucosamina, formando um polissacarídeo cristalino representado pela fórmula geral $[C_8H_{13}O_5N]_n$. Normalmente é denominado poli[β (1→4)-N-acetil-D-glucosamina] ou N-acetilglucosamina. (referencia) Sua massa molecular é estimada de 1 a 2×10^6 Dalton.

A estrutura química da quitina é muito semelhante à da celulose. A principal diferença entre elas se encontra no tipo de grupamento situado na posição axial no carbono 2 do anel de piranosose. No carbono da celulose encontra-se uma hidroxila, enquanto na quitina tem-se um grupamento mais volumoso que é uma acetamida (-NHCOCH₃), esta diferença pode ser melhor visualizada na figura abaixo

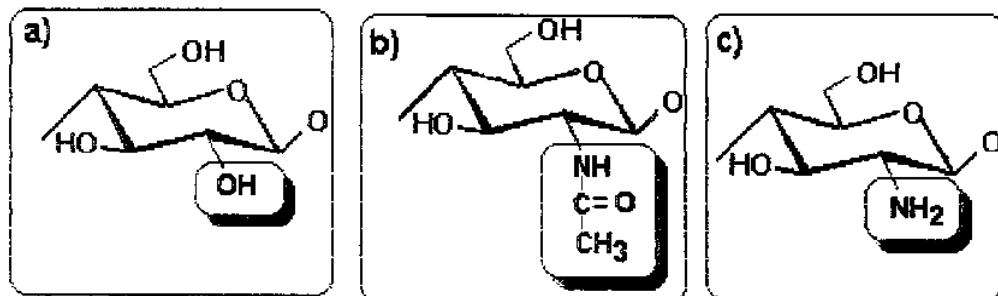


Figura 2 - Principal diferença entre as estruturas de celulose, quitina e quitosana.

A quitina é conhecida em três formas estruturais diferentes, α -, β e γ , mostradas na Figura 3. Destas as α -, β - quitinas, são as mais conhecidas, sendo a

α -quitina a mais comum e por isso também é a mais estudada. A estrutura da γ -quitina é muito pouco conhecida devido à rara ocorrência e formação natural.

A quitina é biodegradável, não-tóxica, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. É despolimerizada na presença de ácidos minerais fortes, sendo parcialmente solúvel em solução de dimetilacetamida com 5% cloreto de lítio

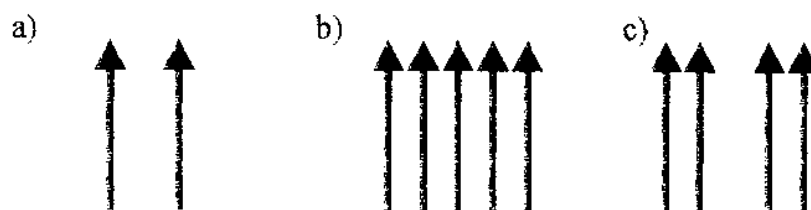


Figura 3 - Representação do arranjo das cadeias poliméricas das quitinas conhecidas: a) α b) β e c) γ

A quitina poli[β (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-dioxi-D-glicopirranose] é um biopolímero obtido normalmente pela desacetilação química da quitina, sendo representada pela fórmula geral $[C_8H_{11}O_4N]_n$. É normalmente denominada de poli[β (1 \rightarrow 4)-N-cetil-D-glucosamina] ou N-glucosamina, portanto, assemelha-se quimicamente ao biopolímero original quitina.

A quitosana possui no carbono 2 uma amina primária ($-NH_2$), como mostra a Figura 1. Esta diferença faz com que a quitosana tenha certas características químicas e físicas diferentes da quitina e da celulose, que na maioria dos casos são consideradas bem mais interessantes como, por exemplo, o fato de ser um polieletrólito, possuir melhor solubilidade, reatividade, etc. (Hirano, 1996).

A quitosana é solúvel em muitos ácidos orgânicos e em soluções ácidas cujo pH seja acima de 6,5.

O grupo amina presente na quitosana possui um pKa em torno de 6,2 a 7,0 o que torna um polieletrólito quando dissolvida em meios cujo pH seja mais baixo. (Azevedo, 2004).

A quitina e a quitosana são uns dos poucos polieletrólitos catiônicos naturais. Diferente dos outros polissacarídeos naturais, que se apresentam neutros ou negativamente carregados. A quitosana dispõe de grupos aminos que reagem com certa facilidade, o que permite a obtenção de muitos compostos derivados.

A quitina, a quitosana e seus derivados são considerados polímeros heterogêneos, porque possuem na cadeia polimérica tanto monômeros acetilados quanto desacetilados, conforme mostra a Figura 4, isto porque, as formas totalmente acetiladas ou desacetiladas, respectivamente, não ocorrem normalmente na natureza e são de difícil preparação e laboratório. (Muzzarelli, 1997).

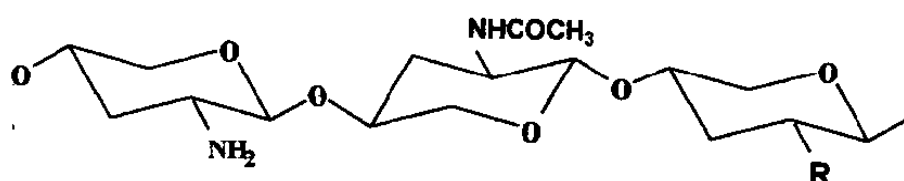


Figura 4 - Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica dos polímeros: quitina (NHCOCH₃), quitosana (NH₂) e forma modificada (R).

A análise elementar da quitina mostra a presença de moléculas de água incorporadas ao polímero. (Muzzarelli, 1997). Alguns pesquisadores estimam que a quitina é constituída de 82,5% de unidades acetiladas, 12,5% de unidades desacetiladas e 5% de água.

De um modo prático, a quitina e a quitosana podem ser distintos pelo critério de solubilidade em solução aquosa de ácido diluído. Quando o polímero possui alto teor de grupos N-acetil ($\geq 40\%$) distribuídos na cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel, sendo denominado de quitina. Quando os mesmos grupos são menores que 40%, este polissacarídeo passa a ser solúvel em solução aquosa de ácido diluído, é então denominado de quitosana. (Peter, 1995).

A dissolução da quitosana em solução aquosa de ácido diluído não se deve apenas ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos N-acetil presentes na quitina, mas também, às propriedades hidrofílicas das unidades de glucosamina (Glc – NH₂), que em pH abaixo de 6 são protonadas levando a um equilíbrio, conforme mostra a equação (1).



A solubilidade de quitosana em solução aquosa de ácido diluído está relacionada principalmente com o grau de N-acetilação (GA) ou N-desacetilação (GD) deste biopolímero.

Portanto, a solubilidade da quitosana pode ser associada à vários fatores: quantidade de grupos N-acetil (NCOCH_3) e de grupos amina (NH_2), distribuição destes grupos na extensão da cadeia polimérica, pH e força iônica da solução.

2.5 – APLICAÇÕES GERAIS DA QUITOSANA

Atualmente a utilização da quitina e de seus derivados em escala industrial ainda é muito menos importante que o uso da celulose, mas alguns importantes seguimentos do mercado empregam derivados da quitina. Dentre estes derivados destaca-se a quitosana.

A grande potencialidade de aplicação em diversas áreas (biomédica, alimentícia, agricultura, tratamento de água, cosméticos e fármacos) juntamente com seu baixo custo e suas propriedades – como biodegradabilidade e baixa toxicidade – têm intensificado as pesquisas com a utilização da quitosana e a sua modificação química.

Dessa forma, o número de publicações relacionadas à quitina e quitosana teve um acréscimo exponencial de aproximadamente 480 artigos no início dos anos 1970 para 9500 artigos no período 2000-2008.

Muitas das pesquisas de aplicação da quitosana encontram-se na área de catálise mostrando suas vantagens na catálise heterogênea como suporte em que a principal vantagem é a recuperação do catalisador ao final da reação, sobretudo quando este agrega um alto valor.

As primeiras referências da quitosana como suporte catalítico foram citadas no início dos anos 80 para a preparação de catalisadores na hidrogenação. Recentemente, catalisadores de quitosana modificada têm sido preparados para diferentes reações como: reação de oxidação, ciclopropanação de olefeínas, reação de carbonilação, entre outras. Verifica-se também referências de catalise heterogênea com o uso direto da quitosana como catalisado pela sua funcionalidade natural, como na síntese de monoglicerídeo.

As modificações na estrutura da quitosana para formar derivados com características adequadas e propriedades ampliadas geralmente envolvem os grupos – NH_2 e – OH presentes nas cadeias dos polímeros.

Alguns exemplos de derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação estão exemplificados na Figura 5. Dentre os derivados da quitosana destacam-se os sais de quitosana que carregam cargas positivas permanentes nas cadeias do polímero devido à quartenização dos átomos de nitrogênio do grupo amina. Devido as características ácidas destes sais também pode ser investigado seu uso na catálise.

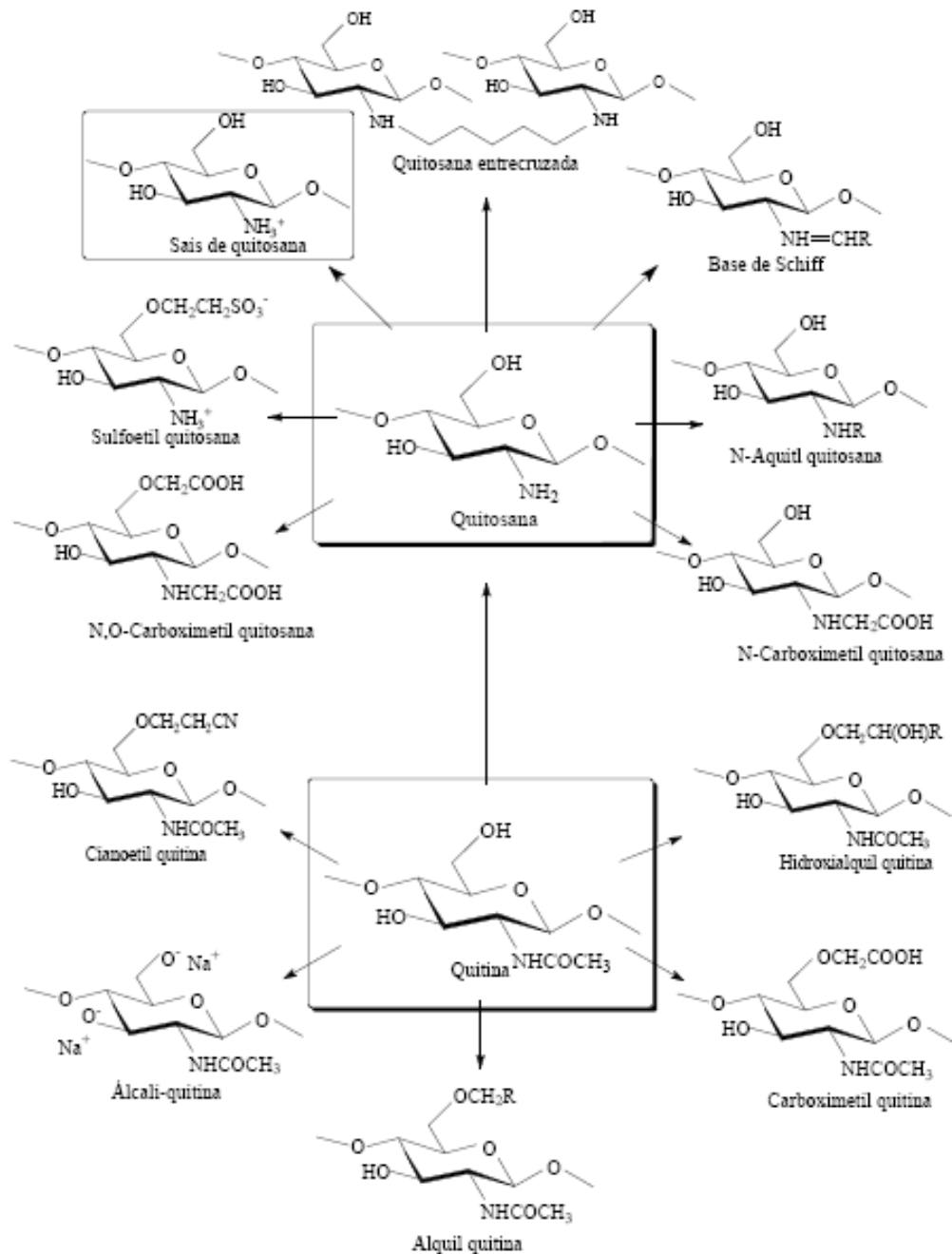


Figura 5 - Derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação.

2.6 – MISTURAS POLIMÉRICAS

A pesquisa para obtenção de novos materiais, através de modificações de polímeros já conhecidos ou da mistura de polímeros, tem mostrado novas direções para a produção de materiais economicamente viáveis e com propriedades desejáveis. (Cypriano, 2005)

O fenômeno de misturar materiais é conhecido desde idades pré-históricas, quando ligas de novos metais deram origem a outros materiais como o bronze. Desta forma, dois ou mais polímeros podem ser misturados para resultar produtos com propriedades desejáveis, porém a idealidade raramente é atingida devido a alguns problemas inerentes e fundamentais.

Grande parte dos pares de polímeros que entram na mistura, não é termodinamicamente miscível e, assim, existem duas fases distintas na mistura final. A não miscibilidade resulta em uma interface que pode conduzir a um baixo desempenho do sistema resultante. Por exemplo, uma alta tensão interfacial e pobre adesão entre as duas fases numa mistura, podem levar à redução do grau de dispersão e a separação total durante o processamento ou o uso.

Essa baixa adesão também é responsável por propriedades mecânicas fracas devido à pobre transferência de energia entre as fases, além de impedir a formação de estruturas definidas morfologicamente (Camargo, 2003).

Sistemas poliméricos com dois ou mais componentes são divididos em:

- a) mistura de polímeros (Blendas),
- b) copolímeros
- c) compósitos.

Este trabalho se dedicou à mistura de polímeros ambientalmente degradáveis (EcoBlendas), sistemas em que os polímeros são misturados mecanicamente, sem interações químicas efetivas, como ocorre com copolímeros. Porém, uma melhor dispersão pode ser esperada em copolímeros (em bloco) do que num sistema de mistura que tem os mesmos pares do polímero. Mesmo assim, foi observado que quase todos os copolímeros exibem também algum grau de separação de fase (Camargo, 2003).

2.7 - COMPATIBILIDADE

Compatibilidade é comumente usada para descrever uma mistura completa em nível molecular. Porém, quando temos macromoléculas ou polímeros, as dimensões moleculares são bem maiores e o termo “compatibilidade” deve ser usado com cautela. Por definição, muitos sistemas poliméricos heterogêneos podem ser definidos como compatíveis, embora eles mostrem um certo grau de separação de fases e transições vítreas bem distintas (T_g).

A compatibilidade, ou homogeneidade de uma mistura de polímeros, pode somente ser definida em função das dimensões moleculares da separação de fases, que geralmente podem ser caracterizadas por diferentes técnicas de medida como, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Mecânico Dinâmico (DMA), Análise Termogravimétrica (TGA), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), dentre outras. Conseqüentemente, compatibilidade é tratada como um termo relativo e pode ser definida por um número de compatibilidade, denominado N_c , definido por (Camargo, 2003):

$$N_c = \frac{\text{Tamanho da sonda experimental}}{\text{Tamanho do domínio de Fases}} \quad (2)$$

O tamanho da sonda experimental pode ser a escala de resolução de um instrumento técnico. O tamanho do domínio é a dimensão dispersa na fase de uma blenda.

Assim:

- i) quando $N_c \rightarrow \infty$ (sistema é compatível)
- ii) quando $N_c \rightarrow 1$ (sistema é semi compatível)
- iii) quando $N_c \rightarrow 0$ (sistema é incompatível)

Na Figura 6, tem-se uma representação esquemática de um sistema de duas fases, que ilustra a definição de um sistema compatível, incompatível e semi compatível usando DMA.

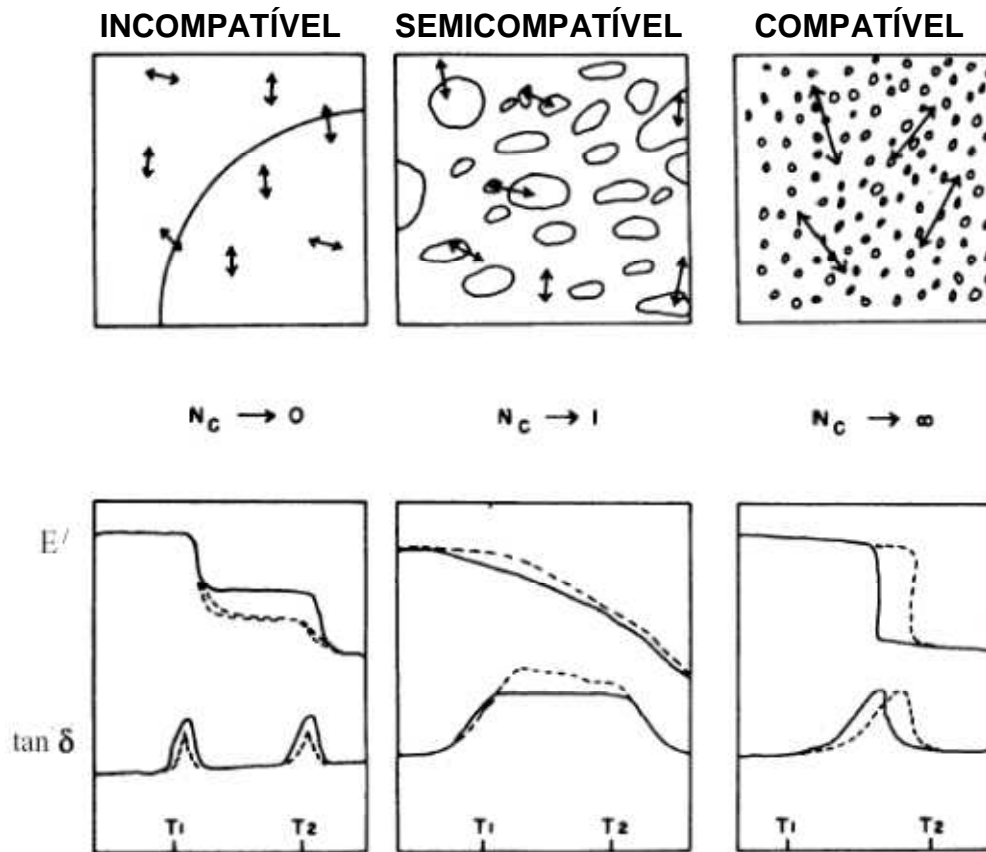


Figura 6 – Representação de um sistema de duas fases por DMA.

Quando N_c chega a zero, a dimensão de cada fase existente, num sistema bifásico, é muito maior que o tamanho da sonda do instrumento e, assim, este pode detectar duas transições que correspondem a cada fase. Em outras palavras, duas Tg's distintas serão observadas.

Para o caso compatível (N_c chega a ∞), o tamanho de sonda é muito maior que as dimensões de fase e, assim, o instrumento não pode detectar flutuações pequenas na composição. Com isso, apenas uma única Tg média, correspondendo aos dois componentes, será medida.

Para o caso semi compatível, um grande efeito é observado e a curva de $\tan \delta$ tem uma larga faixa de temperaturas, desde a mais baixa até a mais alta, correspondentes às transições associadas a cada componente. Assim, o registro de

uma única ou de duas transições, no DMA, dá uma indicação das dimensões moleculares ou número das fases presentes no sistema.

A dimensão (domínio) que corresponde na análise dinâmico-mecânica (DMA) é aproximadamente 15 nm. A técnica de RMN pode detectar outras flutuações na composição ou na variação dimensional que chega a 2,5-5 nm.

2.8 – MISCIBILIDADE

Na literatura tecnológica o termo “miscibilidade” é usado para definir a interação entre pares de polímeros, em nível molecular. Portanto, miscibilidade não é sinônimo de compatibilidade. Compatibilidade é usada para caracterizar a facilidade relativa de obtenção ou o desempenho dos polímeros em uma mistura.

Os componentes da blenda podem ter uma segregação de fases, podem não ser miscíveis sobre o ponto de vista termodinâmico, mas se houver propriedades desejáveis na blenda ela é considerada compatível (Camargo, 2003).

Um aspecto determinante das propriedades das blends é a miscibilidade. As blends são definidas em duas classes distintas: *blendas miscíveis*, quando apresentam homogeneidade em escala molecular, associada a valores negativos de energia livre de mistura, ΔG_m , e *blendas imiscíveis*, quando o material apresenta duas ou mais fases apresentando valores positivos de ΔG_m (Ultracki, 1998).

Uma outra classificação é a baseada na transição vítrea das blends e tempos de relaxações. Considera que além dos casos descritos anteriormente, a situação onde existem estruturas com duas ou mais fases, sendo cada uma delas constituída de uma mistura miscível com concentração distinta e finita de cada componente. Este tipo de mistura é classificado como parcialmente miscível (Camargo, 2003).

É um quarto tipo de estrutura multifásica, em que se observa somente uma transição vítrea, porém, ocorrendo em uma faixa de temperatura mais ampla que aquelas observadas em sistemas de uma única fase. Este comportamento é atribuído à presença de microheterogeneidades, ou seja, à presença de diferentes microambientes com dimensões da ordem de poucos segmentos de cadeia.

As propriedades das blendas são diretamente afetadas pela miscibilidade. A mistura entre macromoléculas resulta em baixa variação de entropia, por isso, para que haja miscibilidade, o fator entálpico deve ser favorecido, ou seja, é necessária a existência de interações específicas tais como: ligações de hidrogênio, interações entre íon-dipolo, dipolo-dipolo ou elétrons π .

Entretanto, estas interações ocorrem em apenas alguns sistemas, de maneira que a maior parte destas blendas é imiscível (Utracki, 1990).

Os tipos de morfologia que geralmente são encontradas em blendas imiscíveis são: (a) dispersão de um polímero em uma matriz polimérica e (b) morfologia de duas fases contínuas.

O tipo de morfologia que será favorecido depende da natureza dos componentes da blenda, e muitas vezes da forma de obtenção. Em misturas mecânicas, a razão de viscosidade dos polímeros na temperatura de processamento e da composição da blenda, assim como cisalhamento e fluxo determinam a morfologia da mistura (Utracki, 1990).

As blendas imiscíveis apresentam uma alta tensão interfacial que, juntamente com a alta viscosidade dos polímeros, dificulta a dispersão de uma fase na outra durante o processo da mistura, favorecendo a coalescência. A baixa estabilidade deste sistema também permite que a coalescência se acentue ao submeter o material a algum processo posterior, como a moldagem, ou mesmo com o tempo de uso.

Outra característica de blendas imiscíveis é a baixa adesão entre as fases. Quando um material é submetido a um esforço mecânico, a transferência de tensão de uma fase para outra ocorre na interface. Se a interação entre as fases for baixa, nesta região ocorrerá um acúmulo de tensões quando o material for solicitado mecanicamente, o que acabará originando uma fratura (Camargo, 2003).

Entretanto, as blendas imiscíveis podem adquirir boas propriedades mecânicas se a interface for modificada pela ação de agentes que sejam capazes de reduzir a tensão interfacial, promoverem a dispersão, aumentar a adesão interfacial e estabilizar a fase dispersa contra a coalescência.

Estes agentes, chamados de compatibilizantes, podem ser adicionados como um terceiro componente ou gerados *in situ*. As blendas que adquirem as propriedades desejadas e resistem à coalescência após a mistura são chamadas de

compatíveis, o que não significa que sejam miscíveis do ponto de vista termodinâmico (Camargo, 2003).

2.8.1 - TERMODINÂMICA E MISCIBILIDADE

A miscibilidade é um fator relevante na preparação de blendas e há uma dependência relevante das variáveis como, temperatura, pressão, massa molar, estrutura molecular, dentre outras. Ela pode ser avaliada, para uma mistura qualquer, pela energia livre molar de mistura de Gibbs (ΔG_m), que está relacionada com a entalpia de mistura (ΔH_m) e com a entropia de mistura (ΔS_m) do sistema (equação 3):

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M \quad (3)$$

Uma definição simplificada de blendas poliméricas, adotada no dia-a-dia, compreende uma mistura de pelo menos dois polímeros, ou copolímeros. Entretanto, quando o fator miscibilidade é importante, define-se:

- a) Blendas poliméricas miscíveis: misturas homogêneas de polímeros, onde a variação de entalpia < 0 favorece a miscibilidade e contribui para uma significativa diminuição da energia livre de Gibbs para a mistura (equação 4):

$$\Delta G_M \cong \Delta H_M \leq 0 \quad (4)$$

O poli (óxido fenileno) e o poliestireno exemplificam este tipo de blenda.

- b) Blendas poliméricas imiscíveis: neste caso a variação de entalpia > 0 não favorece a mistura (equação 5):

$$\Delta G_M \cong \Delta H_M \geq 0 \quad (5)$$

Como exemplo de blenda imiscível temos o acetato de celulose e poliestireno.

2.8.2 - BLENDA POLIMÉRICAS

2.8.2.1 - ASPECTOS GERAIS

O estudo e a obtenção de blendas poliméricas é uma saída para a modificação das propriedades de materiais poliméricos. As blendas de polímeros miscíveis são materiais que podem apresentar propriedades mecânicas melhores que as de cada um dos polímeros componentes isolados.

Entretanto, as blendas com muito baixa miscibilidade apresentam separação de fases, e neste caso, as suas propriedades vão depender das propriedades de cada fase. A primeira blenda patenteada de que se tem conhecimento foi a blenda de borracha natural misturada com guta-percha em 1846.

As blendas obtidas de termoplásticos sintéticos que iniciaram a busca de novos materiais pode ter iniciado com a mistura do poli-cloreto de vinila (PVC), que já era conhecido desde 1872, mas a descoberta da sua plastificação com a borracha estireno butadieno (SBR ou Buna-S) na Inglaterra e Government Rubber-S (GBR) nos USA, foi patenteada em 1933. (Nunes, 1996)

E com a descoberta de um polímero plastificante semi-solúvel, o NBR, tornou-se possível a formulação de uma blenda estável e o efeito do baixo peso molecular do GRS no PVC, criando assim a primeira blenda de um polímero termoplástico e patenteada em 1942, iniciando-se assim uma geração e desenvolvimento de blendas com melhores propriedades de impacto. (Nunes, 1996)

No início da década de 60, os polímeros de engenharia foram explorados como resinas básicas para o desenvolvimento de blendas; estes novos materiais oferecem uma melhoria na resistência mecânica a altas temperaturas, em comparação com as primeiras blendas. (Nunes, 1996)

2.8.2.2 - MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE BLENDS POLIMÉRICAS

Segundo Utracki (1989), há uma variedade de técnicas experimentais que podem ser utilizadas para a preparação e caracterização de blends poliméricas. As técnicas mais usadas na preparação de blends, são as indicadas abaixo. Sendo que os itens a e b são os mais usados:

- a) Dissolução dos polímeros em um solvente apropriado, formando filmes por evaporação do solvente (*Casting*);
- b) Mistura mecânica através da fusão dos polímeros e posterior prensagem.
- c) Polimerização interfacial
- d) Mistura de látex
- e) Outros

A) BLENDS EM SOLUÇÃO:

O método de formação de filmes de blends, por evaporação do solvente (“*casting*”) pode levar à obtenção de filmes densos ou ainda porosos.

Quando uma solução polimérica é espalhada sobre uma superfície plana, e é permitida a evaporação total do solvente, um filme denso e homogêneo se forma. Se a mesma camada de solução é introduzida em um banho de não solvente, um filme poroso é obtido. Este tipo de preparação de filme é denominado “inversão de fases”.

Algumas variações da técnica de inversão de fases são utilizadas na prática. Variações na composição da solução polimérica e do banho de imersão, bem como alterações de temperatura podem levar à formação de filmes com morfologias diferenciadas. Esta versatilidade faz do método de inversão de fases um dos mais utilizados na preparação de membranas porosas (Stropnik e col., 1996 e Ullman’sb, 1986).

Os primeiros polímeros utilizados na fabricação de filmes porosos na forma de membrana foram a celuloses e seus derivados (Camargo, 2003), pela sua

disponibilidade e conhecida capacidade de formar filmes. Atualmente é possível preparar filmes porosos a partir de muitos polímeros, como por exemplo, siliconas, polissulfatos, poliimidaz, dentre outros (Camargo, 2003).

B) MISTURA MECÂNICA:

Esta técnica consiste na mistura de polímeros através da fusão dos mesmos. O principal método de produção destas blendas utiliza extrusoras e misturadores do tipo *Banbury*.

A tecnologia envolvida aqui se baseia na termodinâmica e nas condições reológicas do sistema durante o processo de fusão e mistura. Além disso, a morfologia da blenda, a qual dependerá principalmente do grau de mistura e da taxa de resfriamento, é de extrema importância, pois apresenta influência direta nas propriedades finais do material obtido.

Um exemplo de blenda muito conhecido é: de poliestireno/polietileno de baixa densidade.

C) MISTURA REATIVA:

Este tipo de mistura é conhecido como extrusão reativa, e envolve a introdução de grupos reativos em um polímero, com o intuito de aumentar a miscibilidade dos componentes. As reações químicas mais comumente usadas são aquelas que ocorrem entre ácidos carboxílicos ou anidridos com aminas e grupos epóxi, ou ainda entre aminas e grupos epóxi.

Um exemplo de aplicação desta técnica é encontrado na manufatura de blendas imiscíveis de poli (éter fenileno) e poliamida, com adição de anidrido maleico (Camargo, 2003).

D) MISTURA DE LÁTEX:

Consiste na mistura de dispersões aquosas de dois polímeros ou mais. Em termos de morfologia, o tamanho dos domínios é restrito ao tamanho das partículas de látex.

Um exemplo é a reação entre SAN (estireno-acrilonitrila) e AB (butadieno-acrilonitrila) na formação do copolímero ABS (estireno-butadieno-acrilonitrila).

E) POLIMERIZAÇÃO *IN SITU*:

A polimerização *in situ* envolve soluções ou géis de polímeros em monômeros os quais são subseqüentemente polimerizados. A polimerização *in situ* de estireno, que permite a formação de poliestireno de alto impacto (HIPS), é considerada a mais importante em termos industriais. As redes interpenetrantes (IPN's) também são resultados da polimerização *in situ*. O princípio da formação das IPN's é baseado na combinação de dois polímeros, onde um deles é sintetizado ou reticulado na presença do outro (Camargo, 2003).

2.8.3 - MORFOLOGIA DE BLENDA POLIMÉRICAS:

O grau e o tipo de interação entre dois polímeros são os principais fatores que determinam a morfologia resultante numa blenda. A morfologia de sistemas binários, completamente imiscíveis, pode resultar em um sistema de duas fases, onde uma delas estará dispersa na outra, denominada matriz. Outra possibilidade morfológica consiste em uma rede co-contínua e interpenetrante formada por ambos polímeros.

A influência da temperatura no comportamento termodinâmico da blenda polimérica também é importante, pois ela determina o comportamento de separação de fases e a morfologia. Uma blenda homogênea, quando resfriada ou aquecida, pode ser analisada através de uma curva binodal, onde, ocorre uma separação de

fases de acordo com dois mecanismos distintos: nucleação e crescimento (*nucleation and growth* – NG) ou decomposição *spinodal* (*spinodal decomposition* SD). Tais mecanismos dependem da temperatura final e da localização desta entre as curvas binodal e *spinodal* ou inteiramente dentro da curva *spinodal* (Nunes e Inoue, 1996).

Uma solução inicialmente estável, quando levada a uma condição metaestável, entre as curvas binodal e *spinodal* sofre uma separação de fases pelo mecanismo de nucleação e crescimento (NG). Para iniciar a separação de fases é necessário uma energia de ativação para a formação de pequenos domínios (núcleos). A partir desta etapa, a separação de fase continua com o aumento do diâmetro dos núcleos sem que a sua composição seja alterada.

Neste caso, durante todo o processo de separação a morfologia observada é do tipo matriz domínios dispersos. Nas Figuras 7- 8 são representados os diagramas de fase para um sistema binário e ternário.

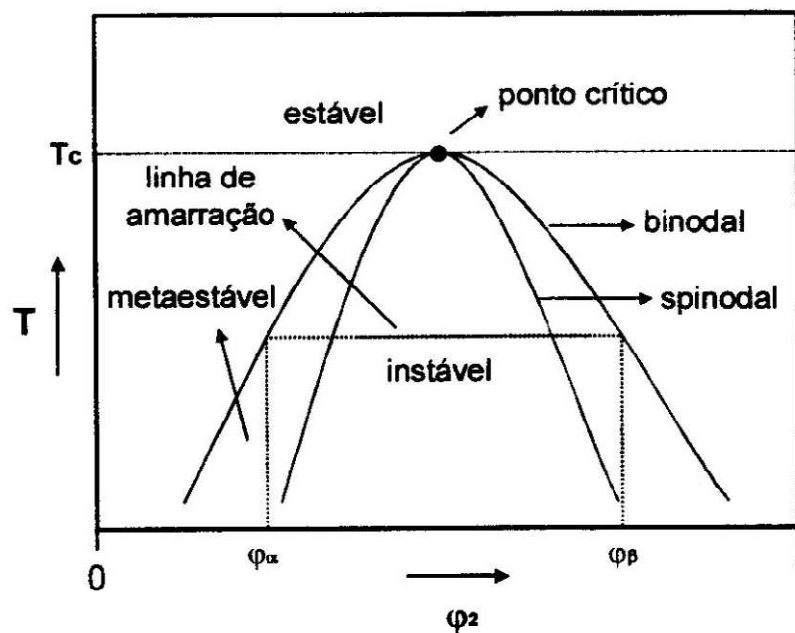


Figura 7 - Diagrama de fases para um sistema binário.

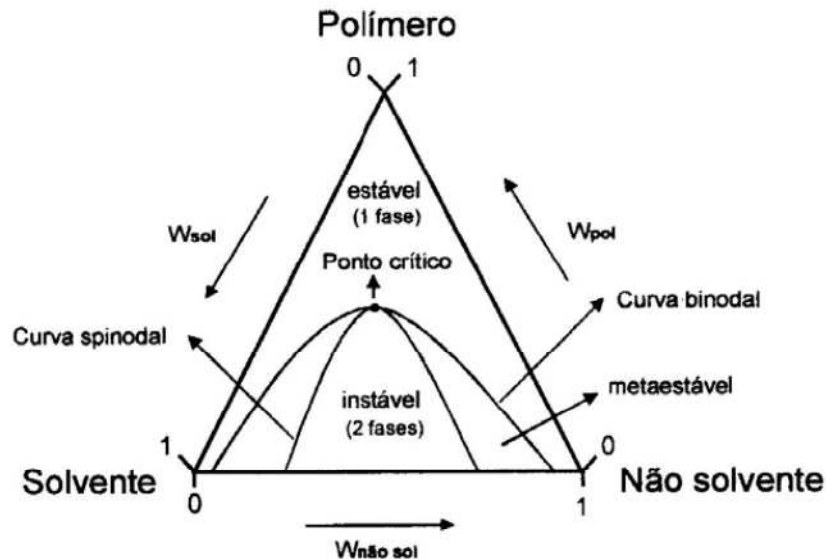


Figura 8 - Diagrama de fases para um sistema ternário demonstrando as curvas binodal e spinodal e o ponto crítico.

Quando a solução da blenda, inicialmente estável é conduzida rapidamente para uma condição instável (abaixo da curva *spinodal*), ocorre a separação de fases pelo mecanismo de decomposição *spinodal* (SD).

Este mecanismo difere daquele de nucleação e crescimento apenas nos primeiros estágios. No mecanismo de NG, a composição dos domínios é constante e somente o tamanho dos núcleos muda com o tempo. Já no mecanismo de SD observam-se três estágios de separação.

Ao analisarmos a solução, no início ocorrem flutuações na amplitude do comprimento de onda com o aumento da concentração. Em um estágio intermediário, tanto a amplitude do comprimento de onda como a concentração vai aumentando com o tempo; a partir deste ponto pode ocorrer a coalescência das fases.

A morfologia observada para o sistema no estágio inicial é de duas fases contínuas e entrelaçadas. Num estágio mais avançado, a morfologia pode evoluir, por coalescência, para o tipo matriz domínios dispersos (Camargo, 2003).

A morfologia obtida para polímeros após um processo de fusão, que pode ser realizada em extrusora ou em misturadores do tipo *Banbury*, depende da tensão interfacial entre as fases, da viscosidade e da elasticidade dos componentes. O componente com viscosidade mais baixa tende a encapsular o componente mais viscoso (ou mais elástico) assumindo assim, a fase contínua.

O tamanho da fase dispersa é governado pela tensão interfacial e pelas características reológicas dos componentes. A forma dispersa pode variar de esferas até fibrilas, dependendo do processamento aplicado.

Freqüentemente existe uma situação intermediária onde uma fase co-contínua ou mesmo uma rede interpenetrante pode ser originada através do controle da composição, da reologia e das condições de processamento.

Portanto, a morfologia obtida durante o processamento é uma estrutura dinâmica que pode estar sujeita a mudanças, originando sistemas que buscam um equilíbrio.

2.8.4 - APLICAÇÕES GERAIS DE BLENDA POLIMÉRICAS A PARTIR DA QUITOSANA

O fator que determina se uma blenda polimérica específica é apropriada para uma dada aplicação é o perfil de necessidade. A necessidade e a especificação de um material são geralmente determinadas por normas padrões (ex.: ASTM, DIN, ABNT) dentro de um segmento industrial. Estas normas padrões são controlados por requisitos obtidos por ensaios ou medições padronizadas e variam em diferentes países e segmentos industriais.

As principais áreas de aplicação para blendas poliméricas são: o mercado automotivo, seguido da indústria de embalagem, eletro-eletrônicos e eletrodomésticos. Os segmentos industriais de menor aplicação são: o mercado de construção civil e a indústria aeroespacial.

2.9 - BLENIDAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM OUTROS POLÍMEROS

2.9.1 - BLENIDAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO /QUITINA E QUITOSANA

Ikejima *et al*,2000, estudaram o comportamento de cristalização e meio de biodegradação em blendas de PHB com quitina e quitosana para a aplicação em filmes de bactérias.

Os filmes foram preparados por meio de solução *casting*, tendo o HFIP como solvente comum. Neste trabalho o PHB, quitina e quitosana foram dissolvidas em HFIP antes da mistura, para evitar que a quitina e a quitosana formem gel através do aquecimento e a degradação térmica.

Neste trabalho, verificou-se que a cristalização do PHB nestas blendas foi suprimida quando a quantidade destes polissacarídeos era aumentada, entretanto a quitosana apresentou maior capacidade de supressão da cristalização do PHB quando comparada com a quitina, conforme a Figura 9

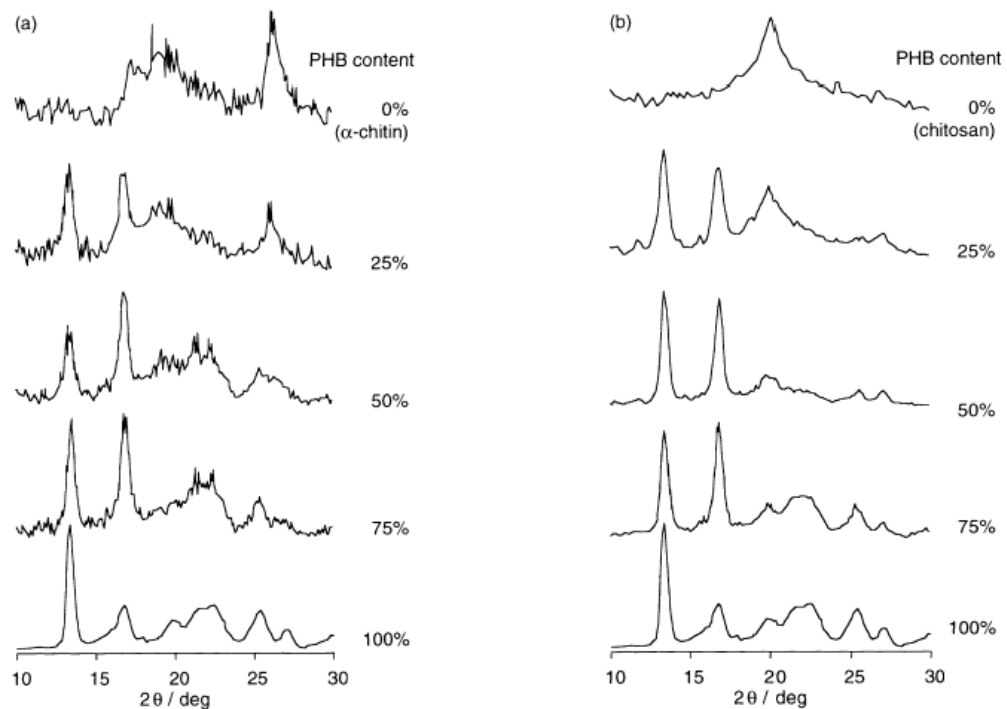


Figura 9 - Difração de raio – x dos filmes de PHB, α -quitina e quitosana, das blendas PHB/ α -quitina e PHB/quitosana: (a) PHB/ α -quitina; (b) PHB/quitosana.

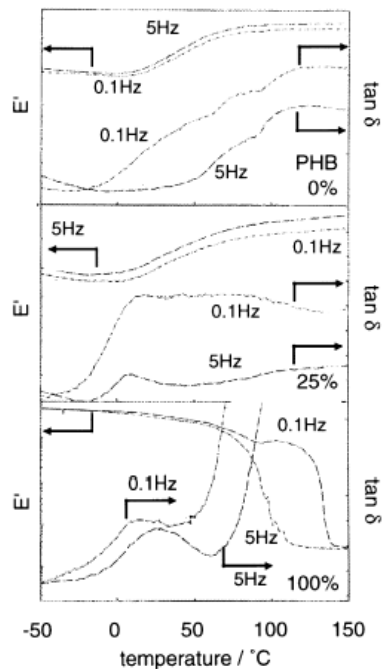
Na Figura 9 estão presentes filmes de quitina, quitosana e blendas contendo 25% de PHB. A figura mostra claramente as difrações que surgem a partir da componente cristalina do PHB, centrada em 13 e 17°.

De acordo com Ikejima e colaboradores, os prováveis fatores que promovem a supressão da temperatura de fusão cristalina (T_m) do PHB na mistura é a diminuição na espessura lamelar dos cristais de PHB e a existência de interações intermoleculares entre PHB e as rígidas moléculas de quitina e quitosana, resultando numa menor flexibilidade da molécula do PHB na mistura e conseqüentemente diminuição da T_m da mistura quando comparada com o PHB puro.

A Figura 10 mostra a viscoelasticidade das blendas de PHB/ α quitina e PHB/quitosana contendo 25 e 50 % de PHB em mesma temperatura, obtida por DMTA. Um método convencional de determinação da T_g usando DSC não pode ser aplicada às blendas de PHB/ α quitina e PHB/quitosana. Os picos de DMTA destas blendas mostram a viscoelasticidade que surge a partir da região amorfa dos componentes das blendas.

O PHB puro exibe uma T_g δ de transição centrada em torno de 15°C, a qual corresponde a T_g do PHB na região amorfa. A temperatura de transição da T_g δ detectada na blenda não pode ser amplamente diferente daquela detectada no PHB puro. A partir deste resultado, o decréscimo na cristalinidade do PHB nas blendas é verificado, podendo ser caudado pela restrição da mobilidade da cadeia do PHB.

As moléculas de quitina e quitosana são rígidas e suas temperaturas de transição são muito elevadas quando comparadas com a do PHB, sendo assim a temperatura de transição na DMTA dos componentes polissacarídeos não podem ser detectadas, devido a dureza dos filmes em altas temperaturas.

(a) PHB/ α -chitin blends

(b) PHB/chitosan blends

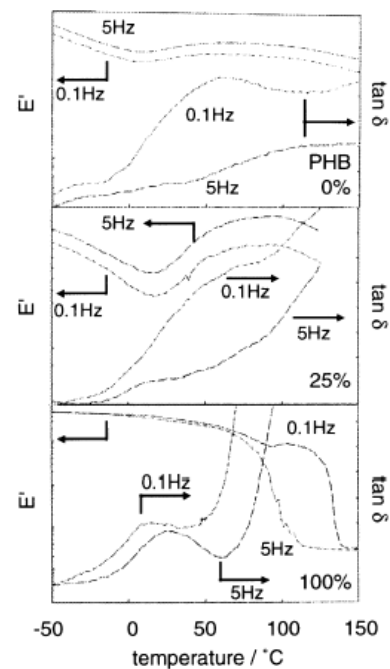


Figura 10 - DMTA do PHB, α - quitina, quitosana e as blendas: (a) PHB/ α - quitina; (b) PHB/quitosana.

2.9.2 - BLENDA DE QUITOSANA COM ÉSTERES DE CELULOSE

As misturas poliméricas, as quais resultam na preparação de novos materiais com melhores propriedades físicas, químicas e mecânicas, faz com que uma devida atenção seja dada para tais misturas poliméricas. As propriedades finais das blendas são determinadas por meio da miscibilidade dos polímeros, a qual favorecida pela formação de pontes de hidrogênio entre os componentes poliméricos. (Chen X. *et al*, 2005).

Chen X., juntamente com seus colaboradores, baseados em estudo já realizados no sentido de analisar a miscibilidade de blendas compostas de quitosana e hidroxipropilcelulose (HPC), estudou e apresentou neste trabalho o resultado obtido com blendas de quitosana (CH) com dois ésteres de celulose, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e metilcelulose (MC). Os estudos foram voltados para a determinação da miscibilidade das blendas formuladas com estes componentes.

Os filmes foram preparados através de solução “*casting*” 0,1M de solução de polímeros em 1% de ácido acético em superfície 2 x 2 x 1 cm de poli(tetrafluoretileno) com posterior secagem em ar a mesma temperatura durante vários dias.

Os difratogramas de alto ângulo das blendas CH/MC presentes na Figura 11, mostram que o filme contendo quitosana pura possui 4 picos de difração ($2\theta = 8.3, 11.28, 18.1, 22.44$), confirmando a presença de domínios cristalinos na estrutura, o que está de acordo com resultados já obtidos por Rihhidj *et al* (2005).

Os difratogramas do HPMC e MC puros revelam que estes são amorfos. Os difratogramas contendo 50% de quitosana mostram picos típicos da quitosana, sendo considerado como uma indicação de imiscibilidade dos polímeros. Para as blendas com 20% de CH o pico é similar a celulose pura, o que indica que esta blenda é mais miscível do que as outras duas. Talvez a miscibilidade desta blenda seja resultado da presença de pontes de hidrogênio via água residual das moléculas.

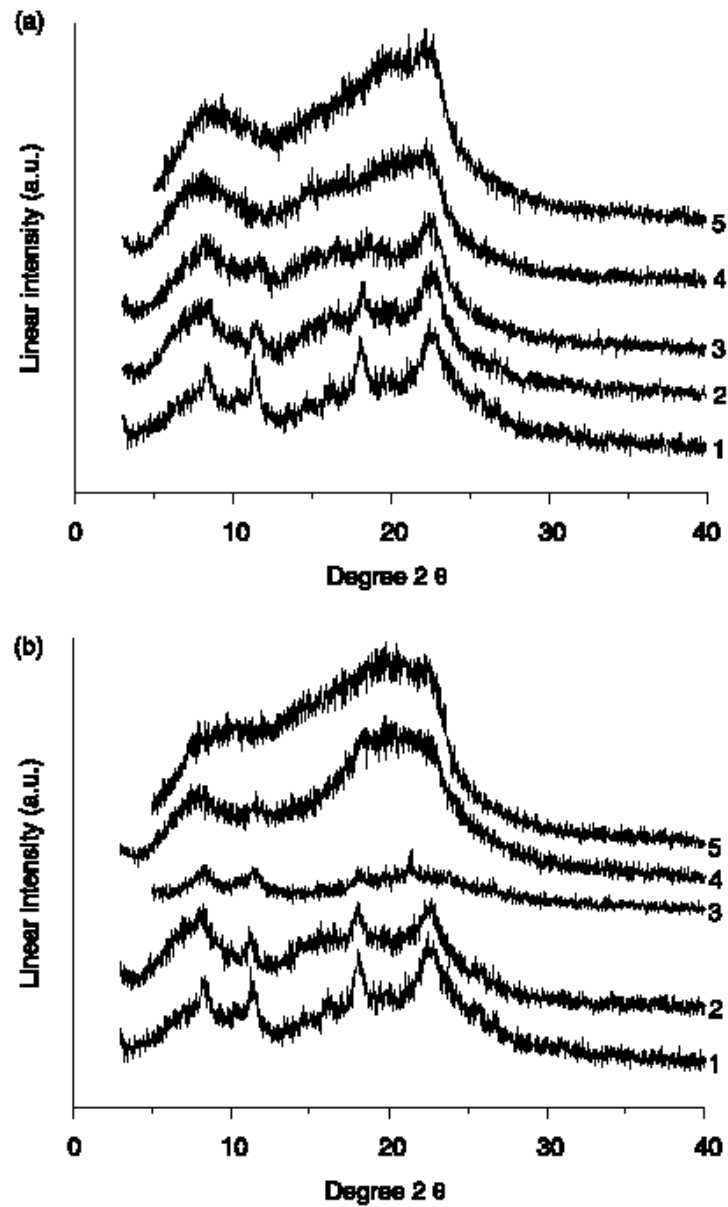


Figura 11 - Difratomogramas de CH/HPMC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of HPMC, (b) difratogramas de CH/MC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of MC.

A verificação de propriedades dos filmes baseados na quitosana e os ésteres de celulose HPMC e MC revelam, que estes não são miscíveis em blendas.

2.9.3 - BLENIDAS DE QUITOSANA COM CELULOSE

Chao e colaboradores formularam blendas de quitosana/celulose usando ácido trifluoracético (TFA) como co-solvente.

A modificação da quitosana por meios físicos como blendas, por exemplo, pode ser conveniente e eficaz para melhorar propriedades físicas para aplicações práticas.

Estudos de blendas de quitosana com macromoléculas sintéticas e naturais são atrativos fortes nos últimos anos.

As blendas de quitosana/celulose são preparadas com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas da quitosana.

Neste trabalho a celulose e a quitosana foram inicialmente dissolvidas em ácido acético (2,0 m%) e ácido trifluoracético (TFA) respectivamente, para a preparação da solução de celulose e quitosana. São feitas blendas de quitosana/celulose em proporções. Através da técnica de evaporação são produzidos filmes com as seguintes composições finais: 3/1, 1/1 e 1/3 (m/m).

Os resultados da análise dinâmicos - mecânica mostra a tensão “*strangth*” dos filmes em função do índice da quitosana. A tensão *strength* da celulose e quitosana são 63 e 34 N respectivamente. A tensão nas blendas fica em torno de 50N, o que revela o predomínio da celulose.

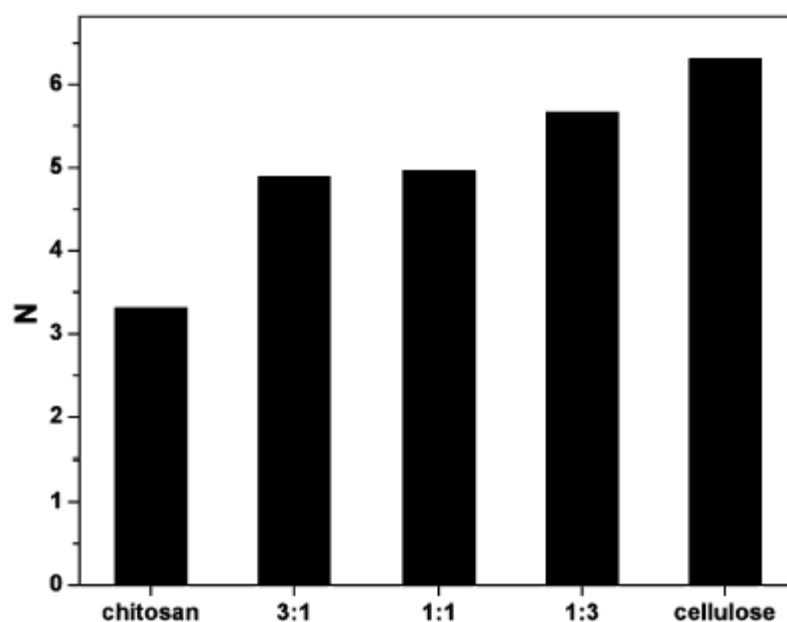


Figura 12 - Tensão “*strangth*” da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

As Figuras 13 e 14 mostram a dependência da temperatura e módulo de armazenamento (E') e (E'') "loss" módulo das blendas de quitosana/celulose e dos polímeros puros. A curva E' e E'' vx temperatura mostra a relaxação característica da celulose, quitosana e blendas. A curva do módulo de armazenamento (E') da quitosana mostra um pico em 0 – 30°, o qual não se vê nas curvas da celulose e blendas. O pico é atribuído a hidratação dos grupos (-CH₂OH) da quitosana. O valor de E' indica que a quitosana pode ser baixo comparado com o a celulose e blendas.

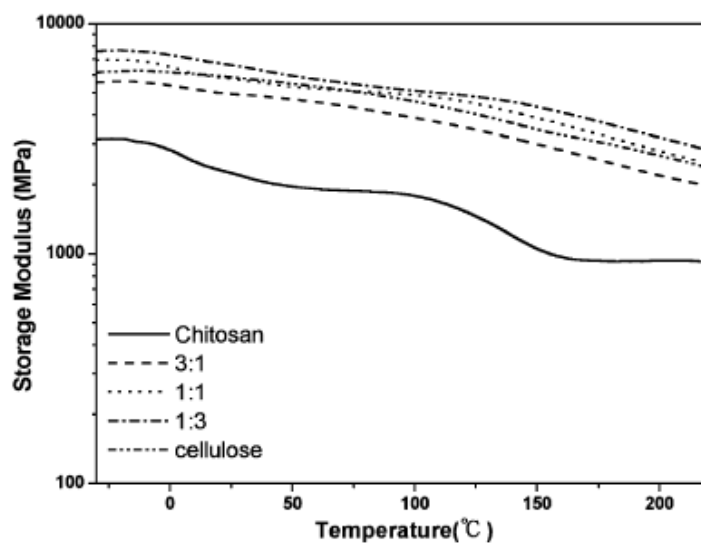


Figura 13 - Módulo de armazenamento (E') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

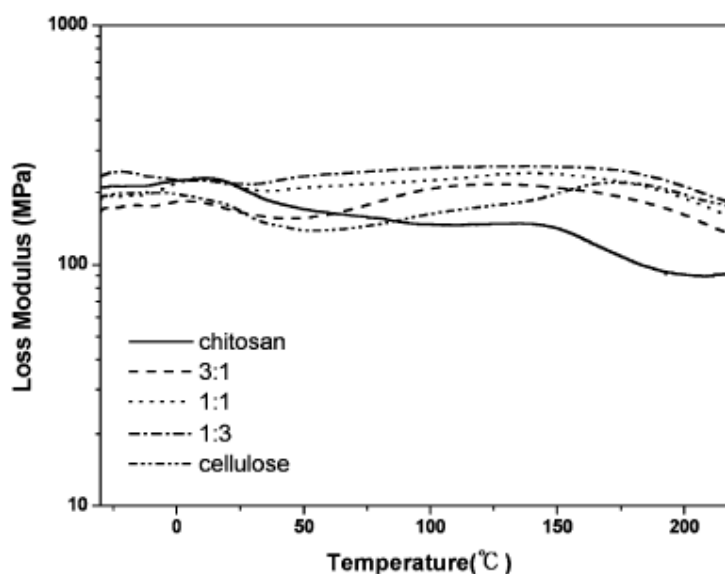


Figura 14 - Módulo "loss" (E'') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

A Figura 15 mostra a dependência da temperatura dos valores da $T_g \delta$ das blendas e polímeros puros.

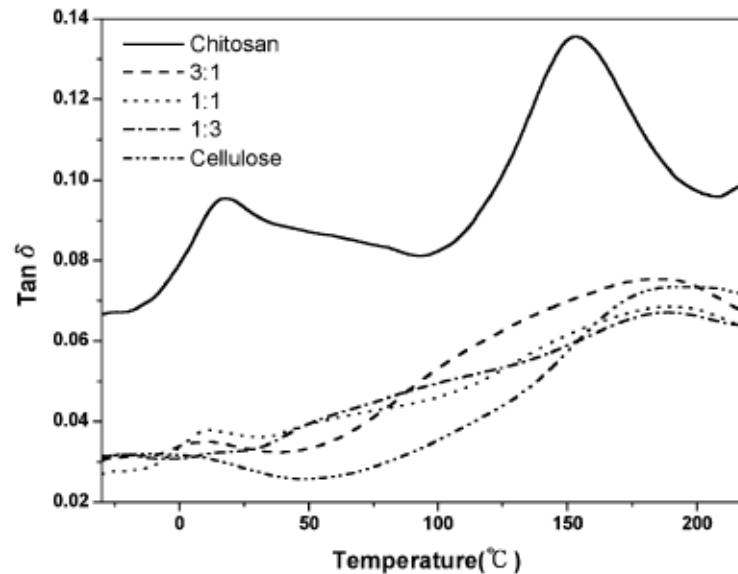


Figura 15 - Dependência da temperatura dos valores da $T_g \delta$ para a celulose, quitosana e quitosana/celulose.

De acordo com o pico da $T_g \delta$ em 190° da celulose, a qual é relatada pelo movimento molecular na região amorfa (Figura 15). A quitosana mostra dois picos em torno de $15 - 22^\circ\text{C}$ e 153°C . O primeiro pico é caracterizado como β relaxação atribuída aos grupos (-CH₂OH) da quitosana. O segundo pico a 153°C é designado como α relaxação refletindo a temperatura de transição vítrea da quitosana.

Estes resultados levam a concluir que as blendas de quitosana/celulose são imiscíveis. As propriedades térmicas, dinâmico – mecânica das blendas mostram que a celulose predomina. O que não é surpresa do ponto de vista cristalino da celulose uma vez que as ligações de hidrogênio intermolecular da celulose são apropriadas para inibir as ligações de hidrogênio nas blendas.

2.10 – MATERIAIS MAGNÉTICOS

Substâncias magnéticas são aquelas que ao serem colocadas sobre a influência de um campo magnético sofrem forças ou torques. Desta forma podemos classificar os materiais pela forma como eles respondem a um campo magnético aplicado, devido à sua susceptibilidade relativa. A susceptibilidade é calculada em relação ao vácuo sendo definida pela razão existente entre magnetização e campo aplicado (equação 6):

$$\chi = M/H \quad (6)$$

Assim podemos classificar os materiais magnéticos em 3 grupos: os diamagnéticos com $\chi < 1$, os paramagnéticos com $\chi > 1$ e os antiferromagnéticos, ferrimagnéticos e ferromagnéticos com $\chi \gg 1$. Materiais diamagnéticos são aqueles que são repelidos pelos ímãs.

O campo magnético gerado pelo ímã faz com que o movimento dos elétrons se altere, como se uma corrente elétrica estivesse passando pelo material, gerando assim outro campo magnético. Esse campo se alinha em direção oposta ao do ímã, causando a repulsão.

Os paramagnéticos são aqueles materiais atraídos pelos ímãs. Eles possuem elétrons desemparelhados que se alinham na direção do campo magnético, diminuindo a energia. Sem a influência do campo, o material mantém os spins de seus elétrons orientados aleatoriamente. Sendo essa a diferença entre os materiais paramagnéticos e ferromagnéticos.

Os materiais ferromagnéticos são aqueles que mantêm sua magnetização à temperatura ambiente quando submetidos a um pequeno campo externo, como é o caso dos elementos do grupo de transição do ferro, como o cobalto, o ferro e o níquel.

Já os materiais antiferromagnéticos e ferromagnéticos tendem a alinhar seus momentos magnéticos na mesma direção, mas em sentidos opostos. Nos antiferromagnéticos os momentos são antiparalelos e de mesma intensidade resultando em uma magnetização nula, enquanto que nos ferromagnéticos apesar dos momentos serem antiparalelos, os momentos vizinhos possuem diferentes intensidades o que resulta em uma magnetização diferente de zero.

Na Figura 16 temos a representação de forma ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais antiferromagnéticos e ferromagnéticos.

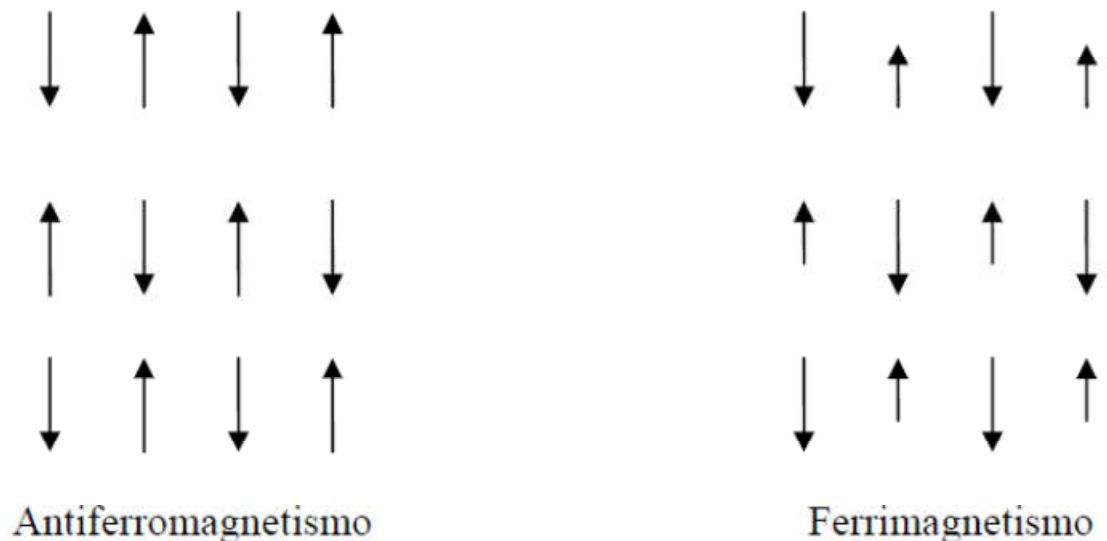


Figura 16 - Representação ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais anti - e ferromagnéticos.

2.10.1 - CURVAS DE MAGNETIZAÇÃO

Um material ferromagnético virgem (desmagnetizado) possui seus domínios magnéticos distribuídos de tal forma que a magnetização total da amostra torna-se nula, como mostrado na Figura 17a. Quando submetida a um pequeno campo externo ocorrem deslocamento das paredes de domínio para diminuir a energia de Zeeman, causando um aumento na magnetização da amostra devido ao deslocamento reversível das paredes de domínio (Figura 17b).

Entretanto, se o campo aplicado for retirado a amostra volta a ter magnetização nula. Conforme o campo externo vai aumentando as paredes de domínio vão se deslocando e ocorre também a rotação dos domínios perpendiculares ao campo (Figura 17c).

Neste momento se tirarmos o campo externo, a amostra já não vai voltar para a configuração inicial devido às imperfeições do material e apresentará uma magnetização diferente de zero denominada de magnetização remanescente, M_r , que ocorre devido aos deslocamentos irreversíveis dos domínios, que acarretam no

aprisionamento de paredes. Deste modo a amostra estará magnetizada. Este deslocamento das paredes de domínio causado pelo aumento do campo externo irá ocorrer até o momento em que todos os domínios magnéticos estejam com a mesma direção e sentido do campo externo e o material atingirá sua magnetização de saturação (M_s), Figura 17d.

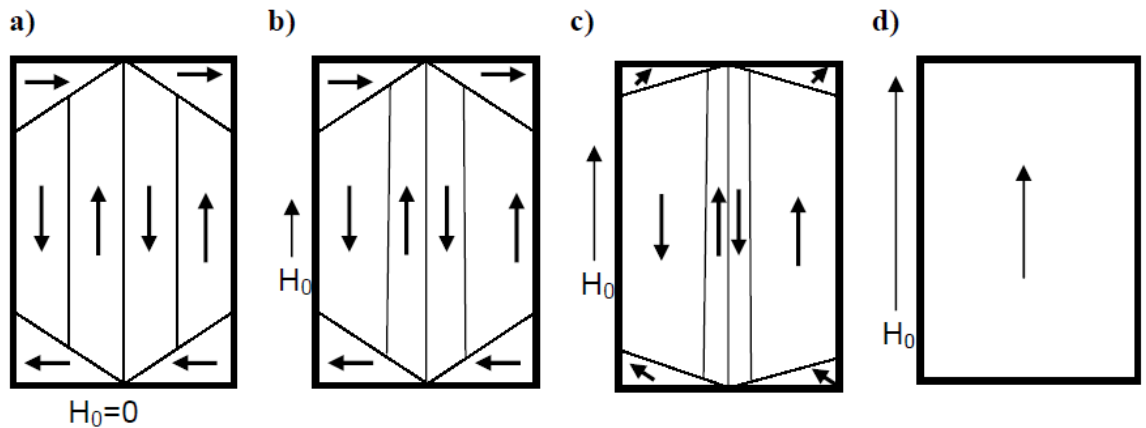


Figura 17 - Esquema ilustrativo da movimentação das paredes de domínio de uma amostra desmagnetizada submetida a um campo externo variável.

Diminuindo o campo aplicado até ficar nulo, encontraremos novamente a M_r . Se continuarmos diminuindo o campo externo, fazendo com que agora o campo esteja no sentido oposto daquele aplicado anteriormente, chegará um ponto onde os domínios magnéticos irão girar deixando a amostra com magnetização nula novamente. Este campo é chamado de campo coercivo (H_c). Fazendo com que o campo aplicado percorra um ciclo completo encontraremos a curva ou ciclo de histerese, como apresentado na Figura 18.

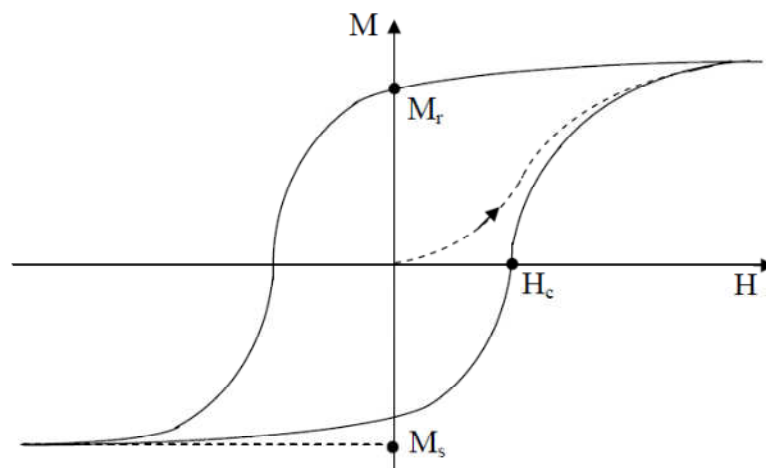


Figura 18 - Representação qualitativa de um ciclo de histerese

2.11 – BIODIESEL

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. Em todo o mundo já se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, que causariam um impacto muito menor no aquecimento do planeta (Gonçalves et. al., 2005). O biodiesel ganhou importância pela sua capacidade de substituir os combustíveis fósseis (Muthu, 2008).

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

O biodiesel é definido como um mono alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais. O seu conteúdo de energia e as propriedades físicas e químicas são semelhantes ao óleo diesel convencional.

Para se produzir o biodiesel, o óleo retirado das plantas ou animais é misturado com etanol (ou metanol) e depois estimulado por um catalisador. Este processo químico é denominado de transesterificação, onde a glicerina é separada da gordura ou do óleo vegetal. O processo gera dois produtos, ésteres (o nome dado ao biodiesel) e glicerina (produto valorizado no mercado de sabões). A Figura 18 mostra o esquema de produção do biodiesel (Furigo et. al., 2009).

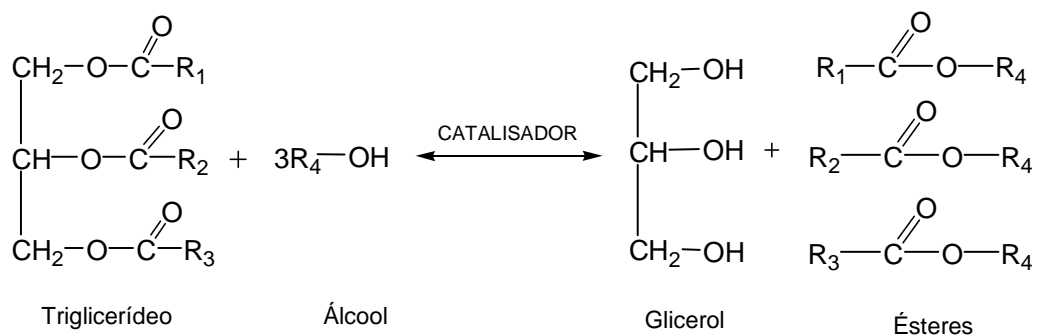


Figura 19 - Esquema resumida da produção de biodiesel.

2.11.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Vários trabalhos têm ilustrado a capacidade das enzimas imobilizadas na produção do biodiesel como catalisador.

Liu e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo onde utilizaram células *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em partículas magnéticas, para a fermentação do etanol em um reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado (MSFBR). O objetivo do trabalho é investigar o desenvolvimento da fermentação do etanol no MSFBR com células imobilizadas em alginato com ferrita.

Para utilizar este sistema (MSFBR) desenvolvido para a produção de etanol a partir de matérias-primas baratas, o melaço de cana foi utilizado como substrato com as células imobilizadas no sistema do reator.

O reator estabilizado magneticamente de leito fluidizado (MSFBR) oferece inúmeras vantagens sobre o leito fluidizado convencional, como a eliminação de resíduos sólidos da mistura, baixa variação de pressão através do leito, facilidade de transporte de sólido, bem como a possibilidade de operação de aumento de velocidade de fluidos e até mesmo a operação em contra corrente. E a produtividade do etanol foi maior no MSFBR que em um reator de leito fluido convencional, sem campo magnético.

Chang e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a síntese do biodiesel a partir do óleo de cozinha em um reator, catalisada para lipase imobilizada para substituir parcialmente o diesel do petróleo. A reação de transesterificação foi realizada utilizando uma imobilização barata da lipase absorvida em tecido têxtil, a fim de reduzir os custos do biodiesel.

O estudo mostrou que o óleo de cozinha usado pode ser suficientemente convertido em biodiesel e demonstra uma abordagem eficaz para reduzir o custo da matéria-prima do biodiesel e lipase, e também para reduzir os problemas de poluição.

Iso e seus colaboradores (2001) realizaram um estudo que trata da produção de biodiesel através da reação de transesterificação utilizando lipase imobilizada, que foi realizado através de partículas de caulita porosa como um portador.

Resultados mostram que a lipase *Pseudomonas fluorescens* imobilizada tem maior atividade que a lipase livre.

Keskinler e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a produção de biodiesel 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. Descreve a síntese do copolímero estireno-divinilbenzeno-poliglutaraldeído (STY-DVB-PGA) imobilizado por lipases para produzir biodiesel a partir de óleo de canola. O copolímero sintetizado foi utilizado para imobilizar a enzima, sendo a imobilização realizada por ligação covalente da enzima sobre a superfície interna do microporo hidrofóbico do poli (estireno-divinilbenzeno). A lipase foi totalmente imobilizada com sucesso no copolímero estireno-divinilbenzeno-poliglutaraldeído.

Alves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo sobre o reaproveitamento de lipase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. O comportamento da lipase imobilizada foi estudado após cada batelada de produção de biodiesel. A reação foi realizada tendo como substrato óleo de babaçu e a enzima empregada como catalisador foi a lipase comercial, os experimentos foram conduzidos por um período de 72h, a temperatura ambiente.

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. Os resultados mostraram que a enzima não apresentou grande perda de atividade podendo ser utilizada em diversos ciclos de produção, e o um solvente utilizado na lavagem do suporte entre os ciclos de produção tem influência na atividade da enzima.

Zong e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a transformação de resíduos de óleo para biodiesel por lipase *Penicillium expansum* imobilizada. Sendo que a imobilização da lipase mostrou ser um eficiente biocatalizador para a produção de biodiesel a partir de resíduos de petróleo com alto valor de solvente ácido orgânico. Foi que revelou que a água a partir da esterificação de ácidos graxos livres e metanol proibindo um melhor rendimento de éster de metil. Adsorventes poderia efetivamente controlar a concentração de água no sistema de reação, resultando em um melhor rendimento de éster de metil. Sílica-gel foi provada ser o melhor adsorvente, proporcionando um rendimento de éster de metil de 92,8%

após 7 horas. Além disso, a preparação enzimática exibiu uma maior estabilidade de óleos usados do que óleo de milho, com 68,4% da atividade enzimática original depois de serem reutilizados mantidos por 12 lotes.

Salis e seus colaboradores (2008) realizaram um estudo utilizando oito tipos de lipases comerciais em macro poros de propileno para a síntese de biodiesel que foram caracterizadas (teor de proteína e atividade específica) e imobilizadas em macro poros de propileno através da adsorção. As lipases apresentaram um nível diferente de adaptação ao suporte, conforme determinado pela comparação de sua eficiência catalítica (atividade/carregamento).

A imobilização das lipases foi comparada com a *metanolisis* do óleo vegetal para obter biodiesel em condições livres de solvente. Das oito lipases imobilizadas somente aquelas de espécies *Pseudomonas fluorescens* foram ativas (rendimento do éster=58 mol% após 22 horas), seguido por imobilização da lipase *Pseudomonas cepacia* (rendimento do éster=37 mol% após 51,5 horas), enquanto todas as outras lipases foram inativas na síntese do biodiesel. Sob condições ideais de temperatura, teor de água e carga obteve um rendimento de éster 98 mol% após 70 horas.

Ettayebi e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo tendo como objetivo a produção de etanol a partir do amido por imobilização de *Candida tropicalis*, na presença de α -amilase. *Candida tropicalis* é um organismo potencialmente útil para a produção comercial do etanol, uma vez que é capaz de fermentar em um amido e demonstra que é um sistema atraente para a produção de biocombustível. O presente trabalho demonstrou que o pré-tratamento de amido com α -amilase é suficiente para obter uma completa fermentação por imobilização livre da *Candida tropicalis*.

A produção industrial de bio-etanol por fermentação direta e liquefação do amido, será muito efetiva na redução nos custos da produção do etanol. Isto levou aos autores a sugerir a utilizar este processo de fermentação do amido em repetitivos lotes ou fermentação contínua para um adicional melhora na produção de bio-etanol, sendo que estudos com *Candida tropicalis* expressando α -amilase e celulosas são promissores e conduzirá uma valiosa aplicação na produção do combustível etanol a partir de fontes renováveis e na conversão do milho em etanol.

O uso de enzimas como catalisadores da reação de transesterificação para produção de Biodiesel, tem se tornado uma opção bastante atrativa, devido a especificidade das enzimas e dos benefícios ambientais e econômicos decorrentes

da utilização deste biocombustível. Rampim e seus colaboradores (2006) tiveram como objetivo, realizar o estudo da lipase de *Thermomices lanuginosus* em particular, na catálise de reações que utilizam óleo de soja e etanol como material de partida.

Na Figura 20, pode-se observar a conversão dos TGs (moléculas de triacilglicerídeos) presentes no óleo de soja em produto final da reação de transesterificação, os ésteres etílicos correspondentes.

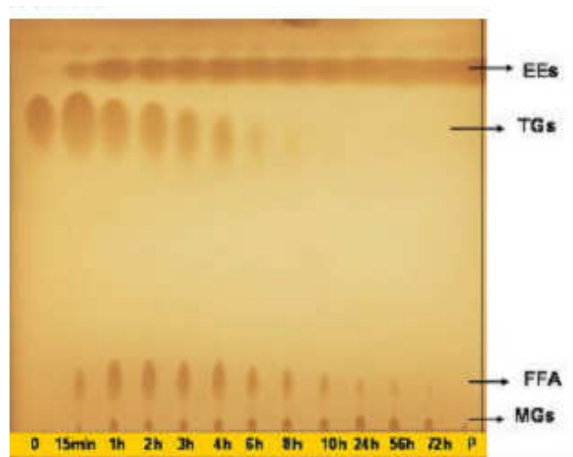


Figura 20 – TLC de 0 a 72horas da mistura reacional da reação de etanolise do óleo de soja para a produção de biodiesel

Na Figura 20, tem-se em 0 óleo de soja e de 15 min. a 72horas pode-se observar o processo da reação. Inicialmente a formação de ácidos graxos livres (FFA) e (mono) glicerídeos (MGs) a partir das moléculas de triacilglicerídeos (TGs) e por último ocorre a conversão destes a ésteres etílicos (EEs).

Tan e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com síntese enzimática de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMEs) a partir da banha imobilizada com *candida sp. 99-125* na produção do biodiesel. O efeito da temperatura, teor de água, quantidade de enzima, solvente e três etapas da metanolisis foram investigados. Tem sido demonstrado que o custo da lipase é grande parte do custo total da produção de biodiesel, e uma das principais vantagens de uma lipase imobilizada é que pode ser repetidamente utilizada durante um período de tempo.

Para investigar a estabilidade da lipase, três etapas da metanolisis foram repetidas a cada 30 horas de cada ciclo, a lipase foi transferida para o mesmo sistema para um novo ciclo. A Figura 21, não evidencia diminuição na atividade da

lipase, que foi observado durante os primeiros 7 ciclos. Rendimentos dos FAMEs foi superior a 80% obtidas durante até o ciclo 7, que mostrou um rendimento de 76,2% e no entanto, o rendimento do ciclo 8 foi apenas de 34,7%.

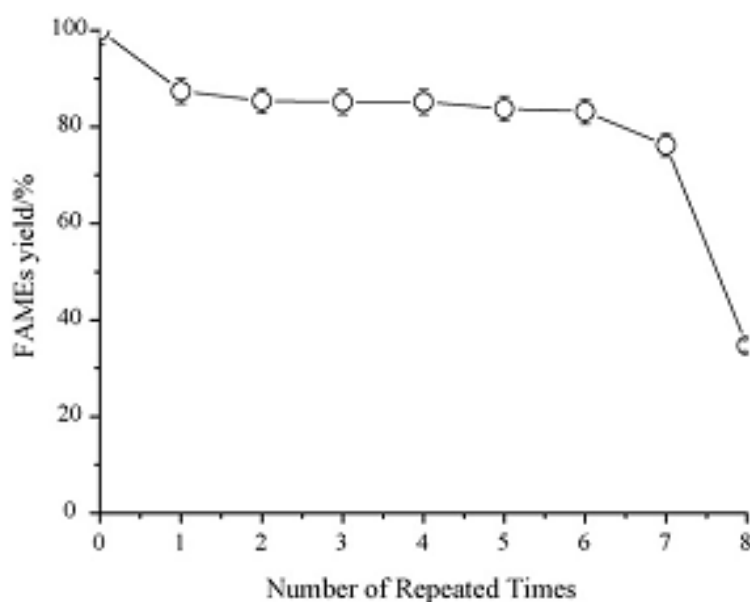


Figura 21 – Estabilidade da lipase imobilizada por repetidos ciclos.

Assim a lipase poderia manter a sua atividade durante pelo menos 180 horas. Estes resultados mostraram que os 3 passos da metanolis com *Candida sp. 99-1t25* imobilizada é eficaz para a produção de biodiesel.

Ettayebi e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com a produção do etanol a partir do amido por imobilização de *Candida tropicalis*, na presença de α -amilase. A *Candida tropicalis* é um organismo potencialmente útil para a produção comercial do etanol a partir da fermentação em um amido, para aumentar a utilização desta fonte de carbono e aumentar a taxa de produção de álcool, nos pré-amido de milho α -amilase, foi utilizada a liquefação do amido que foi suficiente para conduzir a fermentação e para converter 96% de substrato para etanol. Obteve um estudo prévio da viabilidade de produzir etanol a partir da glicose por esta levedura, espécies tanto quanto as células livres ou imobilizadas tanto fenóis e polifenóis em concentrações que são altamente tóxicas para bactérias e outras espécies, demonstrou que é um sistema atraente para a produção de bicomcombustível a partir de recursos renováveis.

Keskinler e seus colaboradores (2009) relatam o estudo da síntese de lipase catalisada por ácidos graxos ésteres de metil (biodiesel) de vários óleos vegetais que usam lipase imobilizada sobre uma matriz polimérica microporosa em diferentes

formas, como um barato biocatalizador. A pesquisa é focalizada em 3 aspectos do processo: (a) síntese, (b) biocatálise de polímeros microporosos e preparação por imobilização da lipase sobre o polímero, e (c) produção do biodiesel. A matriz microporosa do polímero contendo grupo funcional aldeído foi sintetizado pela técnica de poliHIPE que usa estireno, divinilbenzeno, e poliglutaraldeído. A lipase *thermomyces lamuginosus* por ligação covalente é presa sobre o polímero com 80%, 85% e 89% de eficiência na imobilização. A enzima imobilizada foi usada para a produção de biodiesel que usa três óleos diferentes o óleo de girassol, óleo de soja e óleo de cozinha, mostra que a imobilização de enzimas tem atividade durante 10 repetidas reações a 25°C, a cada 24h.

A Figura 22 mostra 3 tipos de óleos diferentes 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%. Este método moderno e simples desenvolvido e efetivo, poderá ter um potencial a ser usado na indústria para a produção de substâncias químicas que requerem enzimas imobilizadas.

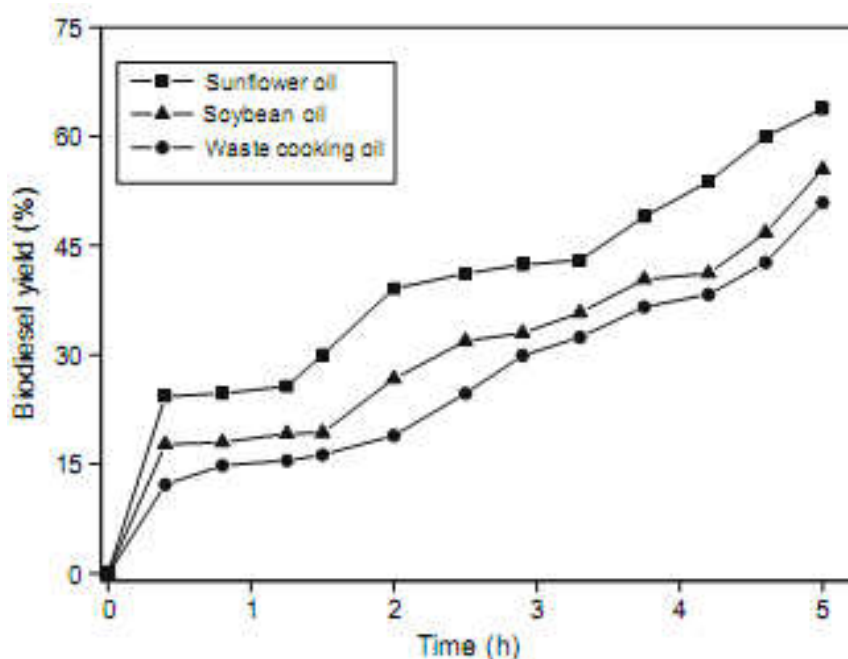


Figura 22 – Variação da eficiência da produção de biodiesel com o tempo para o óleo de girassol, soja e o óleo de cozinha desperdiçado (condições de operação: substrato 21mL/min, temperatura 65°C, reação total 5h)

2.11.2 – PROCESSOS CATALÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL

O termo biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrange os processos em que um catalisador biológico é utilizado para conversão de um substrato em um número limitado de etapas (Oliveira *et. al.*, 2009).

Em geral, o ponto de partida para a escolha de um biocatalisador envolve a especificidade (químio-, régio-, enantiosseletividade) e a velocidade que a transformação é desejada e é efetuada (Oliveira *et. al.*, 2009).

A biocatálise é hoje um dos campos mais promissores dentro de novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microorganismos, de plantas ou células representam os métodos tradicionais de descobertas de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (Carvalho *et. al.*, 2005).

A biocatálise moderna está a desenvolver novas ferramentas e é preciso melhorar uma vasta gama de processos de produção, que reduzem o consumo de energia e matérias-primas e gerar materiais com menos resíduo e produtos secundários tóxicos. Biocatálise é também conseguir novos avanços na área do meio ambiente, de biorremediação enzimática para a síntese das energias renováveis e limpas (Alcalde *et. al.*, 2006).

Atualmente o biodiesel é essencialmente produzido a partir do óleo retirado das plantas e animais por um processo de transesterificação, envolvendo álcool (metanol ou etanol) e um catalisador, homogêneo ou heterogêneo. Quimicamente, o biodiesel é descrito como uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (ésteres mono, di e triglicerídeos). A glicerina, subproduto da reação de transesterificação, pode ser usada na indústria farmacêutica e cosmética (Bordado *et. al.*, 2008).

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. Este

processo pode ser conduzido na presença de catalisadores ácidos, básicos e enzimáticos.

A catálise é o fenômeno em que uma quantidade relativamente pequena de um material estranho à estequiometria – o catalisador – aumenta a velocidade de uma reação química sem ser consumido no processo. A reação catalítica é, pois uma sequência fechada de etapas elementares, análogas à propagação numa reação em cadeia (Guimarães, 2007).

A reação de transesterificação pode ser catalisada por catalisadores homogêneos e heterogêneos. Os catalisadores homogêneos incluem alquis e ácidos. Os catalisadores alcalinos mais usados são hidróxido de sódio, metóxido de sódio e hidróxido de potássio. Ácido sulfúrico e ácido clorídrico são geralmente preferidos como catalisadores ácidos, os catalisadores heterogêneos incluem enzimas.

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 sabonetes que são reações indesejáveis, porque consomem parcialmente o catalisador, diminui o rendimento do biodiesel e complica a separação e purificação (Aracil, *et. al.*, 2004).

Na catálise homogênea, o catalisador e os reagentes estão dispersos na mesma fase, enquanto que na catálise heterogênea, o catalisador constitui uma fase separada. Neste caso a reação química ocorre na interface entre as duas fases, e a velocidade será, em princípio, proporcional à área respectiva. O catalisador é uma macromolécula (enzima), cuja superfície não é uniforme. As reações ocorrem em locais específicos da superfície, os centros ativos (Guimarães, 2007).

A catálise heterogênea tem despertado grande interesse nos setores produtivos e acadêmico-científico. Estes catalisadores apresentam uma série de vantagens bem conhecidas, em relação aos catalisadores homogêneos, como facilidade de isolamento do produto de reação, a possibilidade de obtenção de produtos com alto grau de pureza e de regeneração e reutilização do catalisador, além de não serem corrosivas e dispensarem a etapa de lavagem do produto, o que representa menor geração de resíduos (Soldi *et. al.*, 2007).

Para fazer face às dificuldades encontradas com a utilização dos atuais e convencionais catalisadores homogêneos, nos processos de separação biodiesel/catalisador, começa a ser empregada uma linha alternativa de

catalisadores sólidos, daí designar-se por catálise heterogênea. Por outro lado, estas soluções alternativas e inovadoras de produção de biodiesel permitem rentabilizar economicamente o processo produtivo, tornando-o mais competitivo e também mais sustentável do ponto de vista ambiental.

Neste aspecto, a utilização de sistemas catalíticos heterogêneo para a transesterificação dos triglicerídeos em biodiesel implicará 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 implementado em regime de funcionamento contínuo processual (Bordado *et. al.*, 2008).

A biocatálise se encontra em amplo desenvolvimento atualmente. Pesquisa realizada em vários ramos da química e da biologia tem como principal objetivo desenvolvimento de novos catalisadores para uso industrial. Novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa, foram desenvolvidas a fim de se obter catalisadores com suas especificidades alteradas, bem como a exploração da biodiversidade. Enzimas mais compatíveis com solventes orgânicos e altas temperaturas estão se tornando mais disponíveis, o que certamente levará as indústrias a utilizarem a biocatálise como uma alternativa técnica em comparação com os catalisadores atuais (Conti *et. al.*, 2001).

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento do setor biotecnológico no Brasil, apesar do crescimento econômico brasileiro e as políticas governamentais estarem favoráveis nos últimos anos (o decreto de regulamentação da Lei de Inovação Tecnológica foi assinado pelo presidente Luiz Inácio Lula da Silva no dia 11/10/2005), uma maior interação entre a academia e o setor privado é uma estratégia fundamental para delimitar os problemas que entram o desenvolvimento de programas de treinamento mais específicos de acordo com o interesse industrial dentro das universidades (Oliveira *et. al.*, 2009). Sendo que o Brasil apresenta uma grande vantagem territorial e climática, com uma imensurável biodiversidade ainda pouco explorada.

É importante que a comunidade reflita e lute para promover as interações necessárias, muitas vezes com o laboratório vizinho, vislumbrando o crescimento que pode ser gerado em termos de conhecimento e projetando ainda mais a

visibilidade da Química e outras ciências no âmbito nacional e internacional (Soldi *et. al.*, 2007).

2.12 – BIOCATALISADORES

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídos de proteínas ou glicoproteínas, que participam de muitas reações químicas nos seres vivos. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas catalisam as reações em condições muito brandas, geralmente em soluções aquosas neutras, a temperatura e pressão ambientes. As enzimas também se caracterizam pela especificidade em relação ao substrato, algumas atuando num limitado grupo de compostos, enquanto outras agindo quase que exclusivamente sobre um único substrato (Trevisan, 1993).

As enzimas são usadas há muito tempo, mesmo antes de serem conhecidas, e seu uso estendeu-se gradualmente à produção de bebidas, alimentos, têxteis e medicina. O desenvolvimento da bioquímica, a elucidação dos mecanismos de reação e o desenvolvimento de novas fontes de enzimas diversificaram as suas aplicações (Trevisan, 1993).

As características mais marcantes das enzimas são o seu poder catalítico e sua especificidade. As enzimas têm um enorme poder catalítico. Elas aceleram reações, multiplicando suas velocidades por fatores de, pelo menos, um milhão. De fato, a maioria das reações em sistemas biológicos não ocorre com velocidades perceptíveis na ausência de enzimas (Comerlato, 1995).

2.13 – IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS

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 solúveis 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 comparada 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)

2.14 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (Nascimento *et. al.*, 2004).

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 (Nascimento *et. al.*, 2004).

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (Nascimento *et. al.*, 2004).

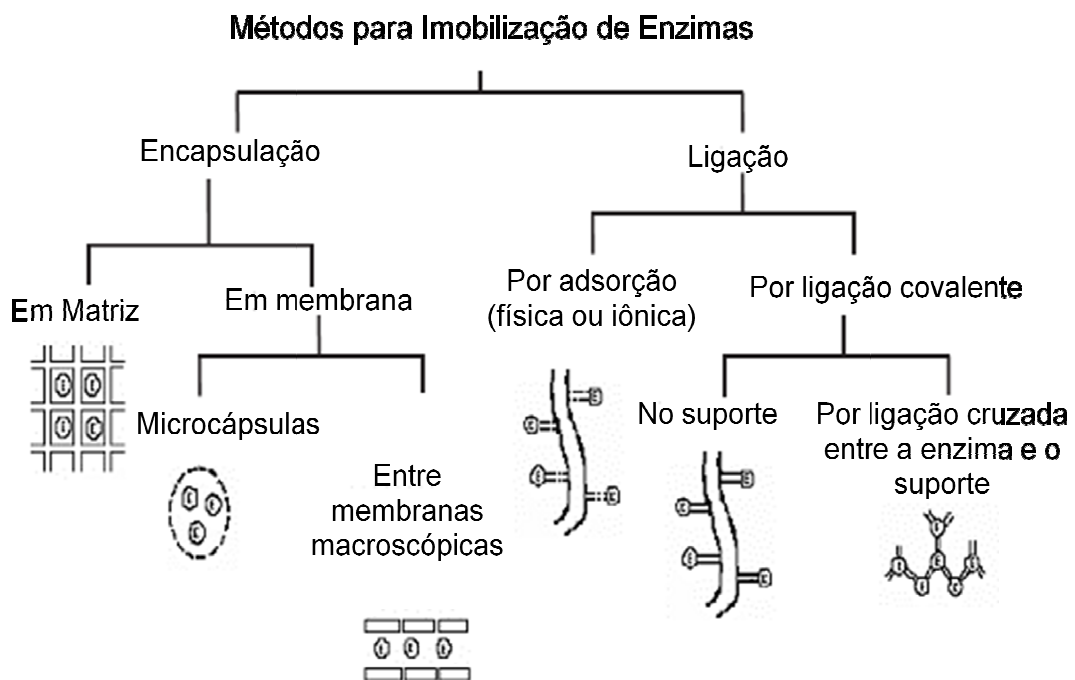


Figura 23 – Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento *et al.*, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento através de uma membrana polimérica. A Figura 23 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Nascimento *et. al.*, 2004).

- LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE

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 (Figura 24).

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 com 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 matam a atividade catalítica das enzimas (Comerlato, 1995).

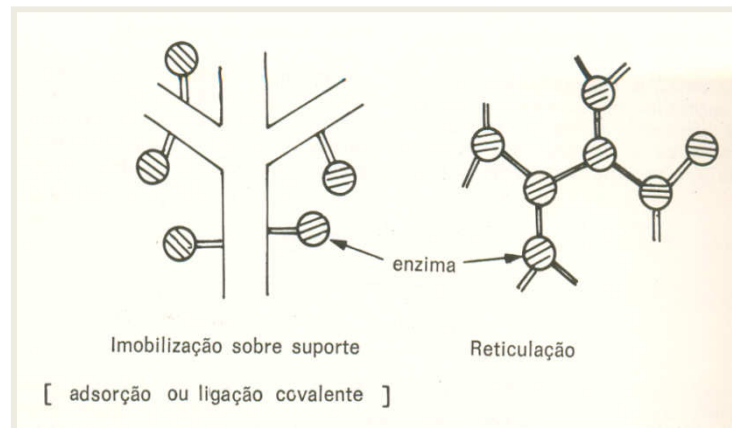


Figura 24 – Imobilização de enzimas sobre suporte.

- LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou suporte inerte. 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 as variações de pH, força iônica, solventes e temperatura (Comerlato, 1995).

- ADSORÇÃO

Este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo (Figura 25). Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima se comparando aos outros tipos de imobilização e, por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica.

A adsorção depende do pH da solução enzimática, obtendo-se valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, no valor de pH correspondente ao

ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada. A adsorção de enzimas em superfícies pode induzir a algumas alterações conformacionais na molécula da enzima devido a interações entre a enzima e o suporte. Suportes hidrofóbicos conseguem adsorver maiores quantidades de enzima e a densidade da camada de adsorção também pode ser maior, relativamente aos suportes hidrofílicos.

Estes resultados indicam que as interações entre a enzima e o suporte são bastante fortes nos suportes hidrofóbicos, o que pode causar, em alguns casos, maiores alterações conformacionais na enzima. Quando se utiliza suportes menos hidrofóbicos, a retenção da atividade aumenta, mas a quantidade de proteína adsorvida diminui e as interações entre a enzima e o suporte serão menores. Este tipo de imobilização pode também ser considerado como uma etapa de purificação da enzima, uma vez que a proteína pode ser seletivamente adsorvida sobre o suporte (Machado *et. al.* 2008).

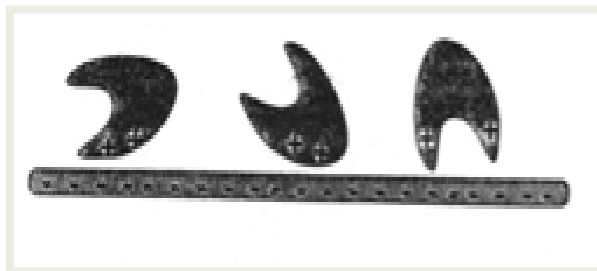


Figura 25 – Método de imobilização de enzima por adsorção em um suporte inerte .

Para melhorar a biocompatibilidade da superfície de suporte para a imobilização de enzimas, Xu e seus colaboradores (2007) criaram um microambiente específico para as enzimas e, assim, beneficiaram a atividade da enzima. Neste trabalho, uma macromolécula natural, a quitosana, foi presa em uma superfície de poli (acrilonitrila-co-ácido maléico) (PAN/CMA) para preparar um suporte de camada dupla para a imobilização de enzimas.

Este apoio foi utilizado para a imobilização da enzima por adsorção física. A quitosana tem sido utilizada com sucesso como suporte para imobilização de enzimas e contém uma grande quantidade de proteína, grupos aminoácidos que atuam como grupos de afinidade. A Figura 26 mostra um esquema para a preparação de apoio e de imobilização de enzimas por adsorção. Conclui-se que o

suporte de camada dupla é um suporte potencial na tecnologia de imobilização de enzimas.

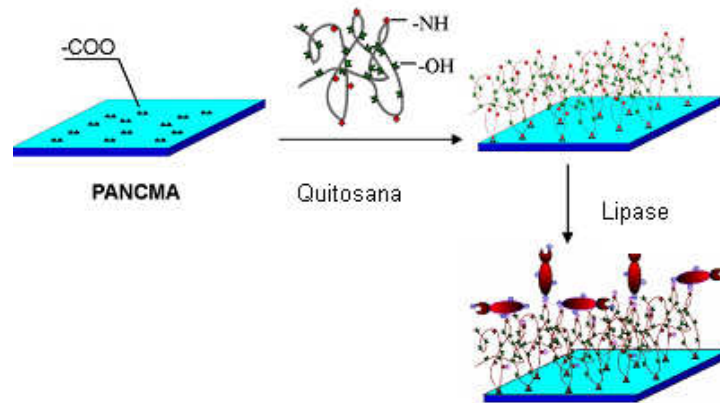


Figura 26 – Representação esquemática da preparação do apoio e imobilização da lipase por adsorção (Xu et. al, 2007).

Besteti e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo desenvolvendo partículas poliméricas para imobilização de enzimas, através da técnica de adsorção física. Os suportes empregados devem apresentar características químicas e morfológicas adequadas para a interação com a proteína. Os polímeros obtidos apresentam caráter poroso, gerando parâmetros de imobilização superiores a de um suporte comercial.

Os materiais poliméricos desenvolvidos foram usados para a imobilização da lipase B de cândida Antártica. O desempenho dessas partículas foi comparado com um suporte disponível comercialmente, Accurel MP 1000, que é à base do pilpropileno. O suporte produzido foi com o núcleo de poli (estireno) e casca de poli (metacrilato de metila), sendo que exibem características morfológicas similares às de um suporte comercial. Os parâmetros de imobilização, para a maioria dos materiais, foram superiores ao do suporte comercial usado com base de comparação.

- CONFINAMENTO EM MATRIZ OU EM CÁPSULAS

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula (Figura 27). A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste

sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos se difundem (Nascimento *et. al.*, 2004).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (Nascimento *et. al.*, 2004).

Microencapsulamento de enzimas tem demonstrado ser uma técnica de sucesso de imobilização. As microcápsulas podem ser facilmente separadas do meio reacional por filtração, e as enzimas imobilizadas têm um potencial de serem utilizadas em vários lotes (Neau *et. al.*, 2002).

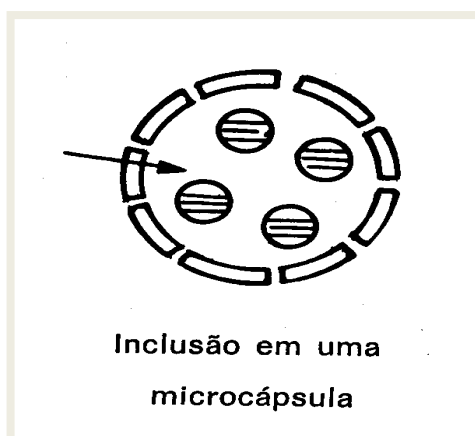


Figura 27 – Imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento.

Neau e seus colaboradores (2002) realizaram um estudo com objetivo de imobilizar a lipase de *candida rugosa* utilizando diferentes polímeros para avaliar o carregamento de enzimas, atividade e caracterização. Agarose, alginato e quitosana foram selecionados para imobilizar a lipase, sendo usada a técnica de microencapsulamento.

As esferas de agarose exibiram indesejáveis inchaços, atividade média e o polímero não foi utilizado, esferas de alginato e de quitosana foram preparados por gelatificação iônica. A lipase pode ser imobilizada com sucesso pelo confinamento em esferas de alginato e de gel de quitosana, a eficiência do confinamento por esferas de alginato ou de quitosana não foi alterada pela diferença do tipo de polímero. A eficiência do confinamento foi de 44-50% em ambos os tipos, mas a atividade enzimática é menor no alginato. A maior atividade de enzimas em esferas de quitosana comparadas às esferas de alginato pode ser atribuída a interação do alginato com a enzima.

Nas esferas secas-congeladas também não a atividade da lipase contendo esferas de alginato e quitosana. A Figura 28 mostra a atividade significativa da esfera de quitosana a 2,0%(m/v).

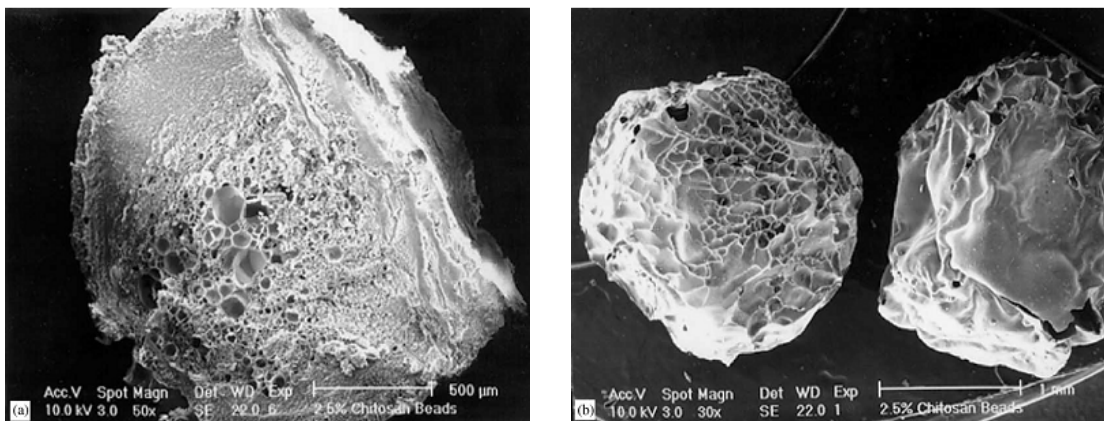


Figura 28 – Microscopia eletrônica (a) corte transversal (b) superfície, esferas de quitosana a 2,0%(m/v).

As técnicas de confinamento e encapsulamento sobre polímeros naturais são cada vez mais conhecidas, devido a seu baixo custo, processo de reutilização, ausência de toxicidade e bom para o meio ambiente. Encapsulamento de enzima é o confinamento físico das enzimas dentro de uma membrana polimérica pela fase de transição do soluto (polímero) contendo a enzima (Ravindra *et al.*, 2009).

Ravindra e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo com uma nova abordagem para a imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* encapsulada em k-carragenina. Nenhuma tentativa foi feita para encapsular enzima em k-carragenina formando cápsulas com o núcleo líquido. O encapsulamento da lipase em k-carragenina foi realizado através de co-extrusão, as cápsulas da lipase eram de forma esférica com diâmetro na faixa de 1,3-1,8mm e uma espessura de 200µm

(figura 29). Na foto da lipase, encapsulada pode ser observado o núcleo interno da solução da lipase e o exterior do núcleo k-carragenina.

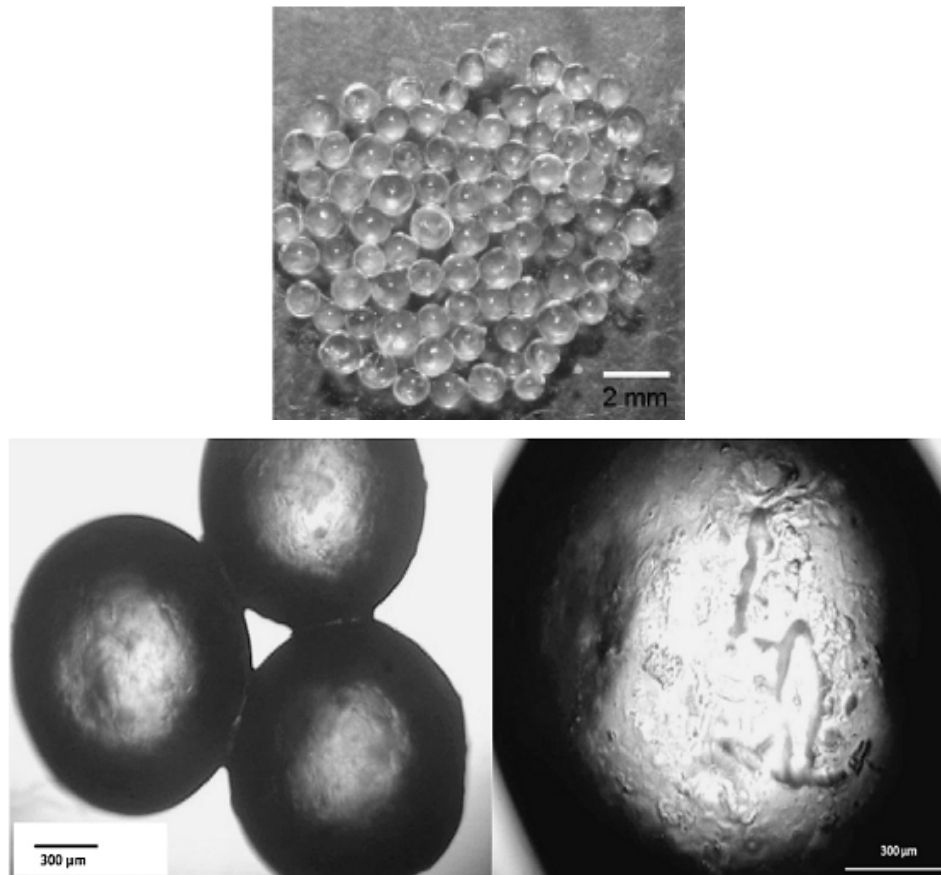


Figura 29 – Fotos da microscopia da lipase encapsulada com o núcleo líquido no meio rodeado por uma matriz de k-carragenina.

O encapsulamento da lipase mostrou bom pH, temperatura e armazenamento de estabilidade semelhante à lipase livre e conserva 72,3% de sua atividade original após utilizada para 6 ciclos. Pode ser armazenada por 10 dias em temperatura ambiente sem mudar sua atividade.

Rilling e seus colaboradores (1997) realizaram um estudo onde citocromo C foi utilizado como um modelo composto para estudar o comportamento das proteínas durante o processo de encapsulamento de microcápsulas de alginato e a perda por difusão durante o armazenamento. Esferas de gel de alginato foram revestidas com multicamadas de membrana constituídas por camadas alternadas de poli (N-vinilamina), poli (ácido acrílico) ou carboximetil celulose. Na prática da

imobilização de enzima duas dificuldades existem: durante a formação de esferas, normalmente ocorre uma sensível perda de enzima; e, durante a aplicação, algumas enzimas são perdidas por difusão na solução. Por este motivo se usa citocromo C para quantificar estes efeitos.

Utilizando a técnica de multicamadas, é possível produzir multicamadas com membranas de ajustável permeabilidade. Se as enzimas são imobilizadas com alginado, obtém-se melhores imobilização e rendimentos quando a concentração de sais na solução de gelificação é mantida tão baixo possível.

2.15– POLÍMEROS NATURAIS UTILIZADOS COMO SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Polímeros naturais têm sido utilizados para imobilização de enzimas em vários estudos (Murat, 1995). Polissacarídeos representam o grupo mais utilizado entre eles, por contribuir para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um micro-ambiente favorável e mantendo dessa forma, a atividade enzimática (Nascimento *et al.*, 2007).

Lee e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo modificando esferas de quitosana com diversos aminoácidos e selecionaram para a melhor atividade de imobilização a lipase, sendo preparada pela ativação da espinha dorsal da quitosana. Portanto, esferas de quitosana com propriedades diferentes poderiam ser facilmente preparadas por introdução de aminoácidos na sua espinha dorsal, considerando que os aminoácidos são materiais adequados para a preparação de esferas de quitosana modificada com o aumento da compatibilidade da lipase.

O processo de preparação é simples e econômico, e alguns aminoácidos são esperados para melhorar o desempenho catalítico da lipase imobilizada. A Figura 30 ilustra o esquema e modificação das esferas de quitosana com diversos aminoácidos

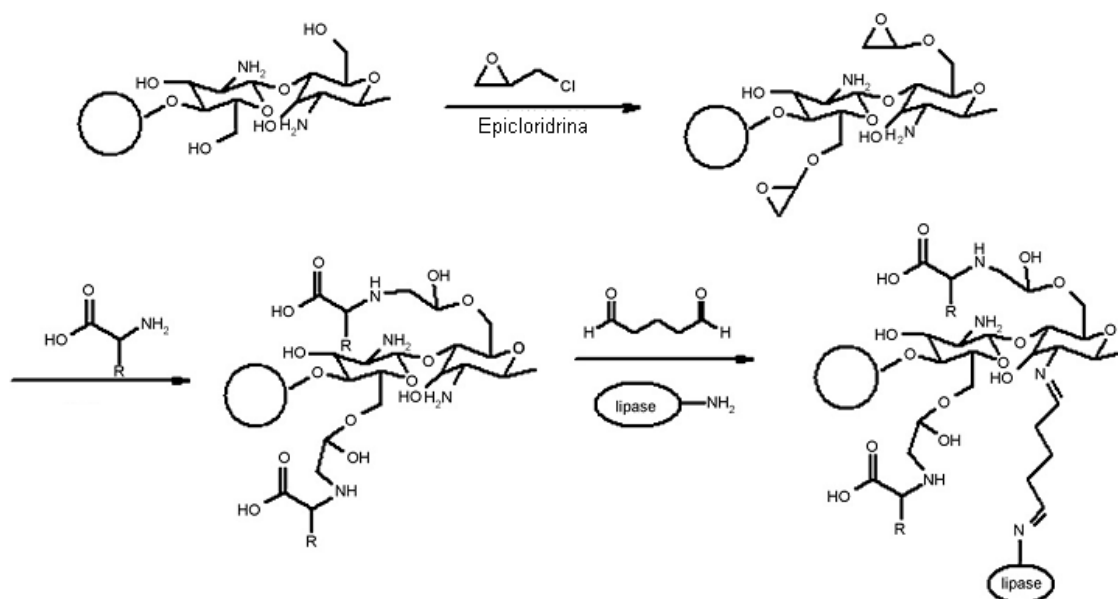


Figura 30 – Ilustração esquemática da preparação de aminoácidos modificando esferas de quitosana e imobilização de enzimas .

Huang e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo com microcápsulas 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. 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 podem ser muito melhoradas. A Figura 31 mostra a reação do grupo aldeído, próximo à superfície das esferas, interagindo com o grupo amino da enzima.

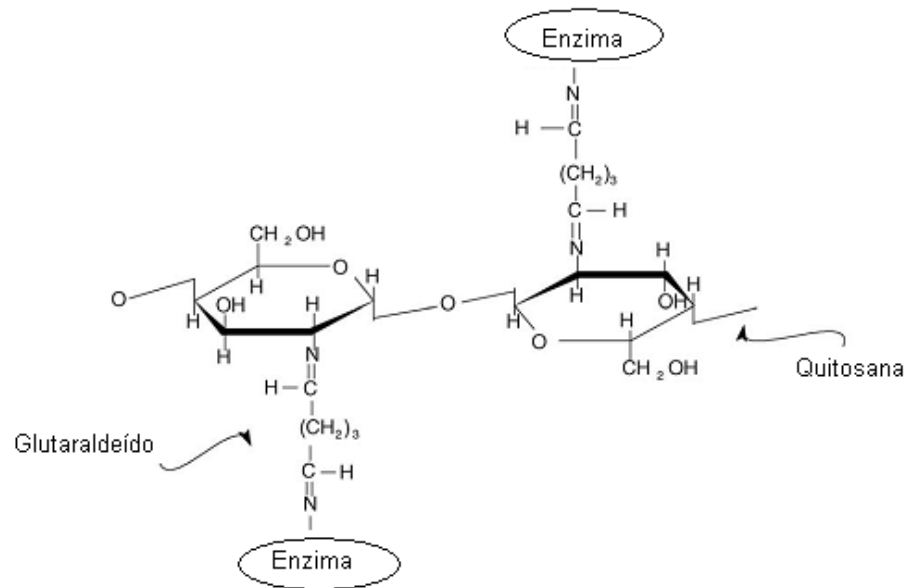


Figura 31 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microcápsulas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído.

A Figura 32 mostra a microscopia eletrônica de varredura do polímero natural quitosana e microcápsulas magnéticas de quitosana, sendo que as microcápsulas 82% tinham partículas de tamanhos de $3\mu\text{m}$ à $6.2\mu\text{m}$ 18% estavam na faixa de $6.2\mu\text{m}$ à $8.4\mu\text{m}$. No entanto a enzima imobilizada apresentou propriedades de estabilidade que melhoraram notavelmente.

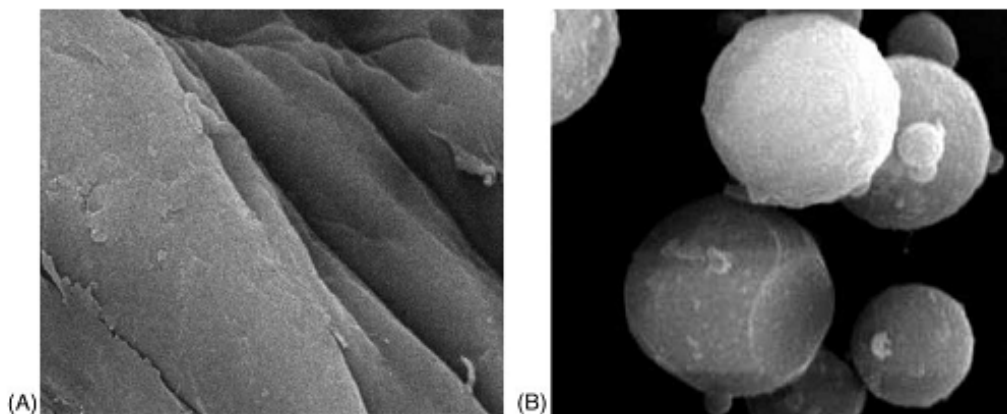


Figura 32 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microcápsulas magnéticas da quitosana (Huang et. al., 2005).

Gonçalves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo 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.

Cruz e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo imobilizando lipase de *Candida antarctica B* em esferas de quitosana para a produção de biodiesel por transesterificação de óleo de mamona. Tais enzimas vêm sendo intensamente investigadas na transesterificação de óleos e gorduras para a produção de biodiesel. No entanto, a aplicação das lipases, como de quaisquer enzimas na forma livre, torna-se inviável devido o fato de perderem atividade. Desta forma, para aumentar a vida útil das enzimas, as mesmas podem ser imobilizadas em suportes sólidos e dentre os vários suportes sólidos é possível destacar a quitosana.

O objetivo específico deste estudo era caracterizar e otimizar as condições de imobilização da lipase de *Candida Antarctica B* em esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído e promover os mesmos experimentos de caracterização para a lipase imobilizada comercialmente. Através do estudo da imobilização da lipase CALB L, constatou-se que a imobilização ocorreu de forma mais eficiente quando a solução enzimática foi incubada com esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 3% (v/v).

Wu e seus colaboradores atuaram na imobilização da lipase (2003) em esferas de quitosana utilizando amonioácidos e seus grupos hidroxila, através da imobilização binária. Por uma escolha adequada do processo de imobilização, os custos operacionais de processos industriais envolvendo lipases podem ser significativamente reduzidos. Através deste método de imobilização binária, a estabilidade térmica e a reutilização da lipase aumentaram consideravelmente.

Foresti e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo utilizando as lipases *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida antarctica B* imobilizadas em quitosana em pó previamente tratada com solução aquosa de glutaraldeído com diferentes concentrações. A quitosana utilizada para este fim cumpre o requisito de ser um material de apoio, além de ser reconhecida pelas suas

excelentes propriedades para imobilização de enzimas, tais como, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

A imobilização foi confirmada em microscopia e as atividades das nove lipases imobilizadas foram testadas. O estudo permite selecionar entre os catalisadores dois materiais que combinam alta atividade e seletividade: CA/CHIT e PF/CHIT/GLU 0,025. A Figura 33 mostra as microfotografias (a) quitosana em pó, (b) PF/CHIT/GLU 0,025, (c) CA/CHIT/GLU 0.025 e (d) CA/CHIT. A foto de (b) mostra um escasso aglomerado da lipase de cândida *Antarctica B*, já em (c) e (d) são claramente visíveis.

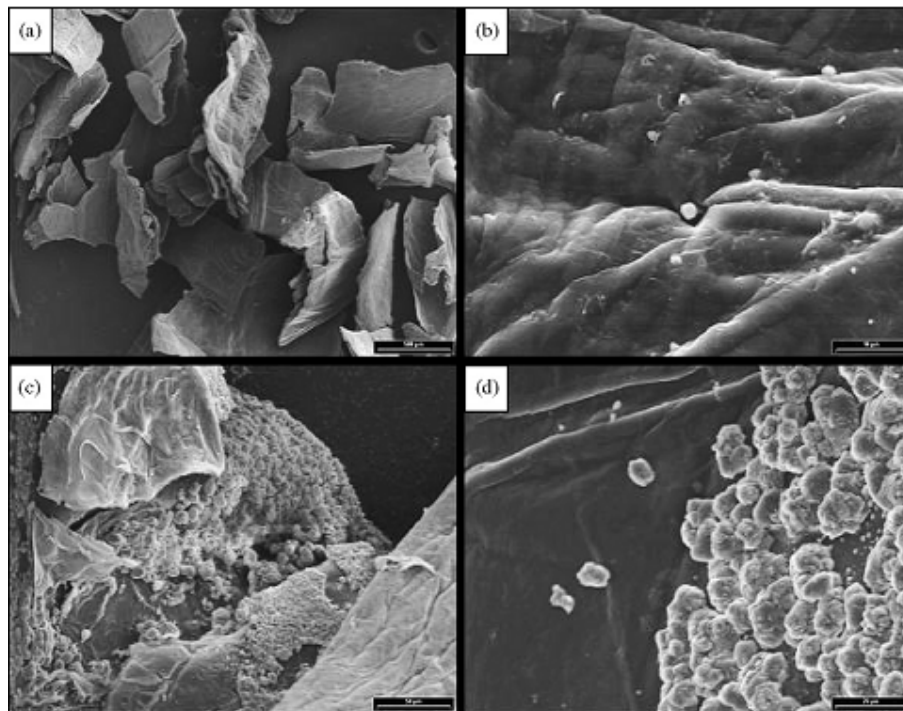


Figura 33 – Microscopia eletrônica quitosana em pó (40 x), (b) FP / QUIT / GLU 0,025 (x 2000), (c) CA / Chit / GLU 0,025 (400 x), e (d) CA / Chit (1000 x) (Foresti et. al., 2007).

Amiji e seus colaboradores (2004) realizaram um estudo preparando microcápsulas de alginato-quitosana a fim de desenvolver uma matriz biocompatível para a imobilização de enzimas. O entrecruzamento do núcleo de alginato foi uniformemente revestido com uma camada de quitosana. Este estudo ilustra um novo método de imobilização enzimática para aplicações biotecnológicas utilizando núcleos líquidos ou sólidos revestidos com uma microcápsula. A enzima é localizada e protegida no núcleo da matriz, enquanto a casca pode regular entrada e saída de substrato e produto.

A figura 34 mostra a micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana, pode ser visto que a mesma possui uma grande porosidade no núcleo.

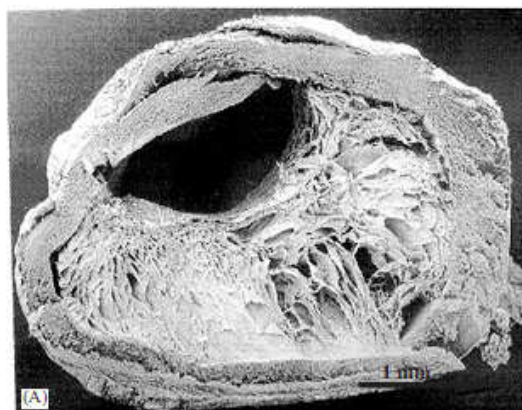


Figura 34 – Micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana .

Murat (1995) realizou um estudo no qual a urease foi encapsulada em esferas xantana-alginato (XA), seguido por glutaraldeído (GA). As esferas retidas apresentaram alta atividade enzimática (75%), juntamente com boa estabilidade operacional, mesmo após 20 utilizações repetidas, e, assim, as esferas de GAXA podem ser utilizadas com sucesso em urease encapsulada por várias razões: encapsulamento com urease apresenta maior atividade enzimática através de pH e temperatura, quando comparado a sua forma livre; a esfera de GAXA pode ser facilmente preparada em polímeros naturais com baixo custo.

Xu e seus colaboradores (2005) realizaram um trabalho onde uma macromolécula natural, quitosana, foi entrelaçada à superfície de uma membrana de poli (acrilonitrila-co-ácido meleico) (PANCMA) para fabricar uma membrana de dupla camada de apoio a imobilização da enzima, já que a quitosana é considerada um apoio adequado para a imobilização. A lipase *Candida rugosa* foi imobilizada sobre esta dupla camada de membrana utilizando glutaraldeído (GA), sendo que o suporte utilizado para a imobilização da enzima é importante uma vez que sua interação com a enzima pode influenciar na estabilidade.

Wu e seus colaboradores (2003) realizaram um estudo onde criaram um novo conceito de imobilização de enzimas, tendo como suporte a quitosana contendo dois grupos hidroxilas ativados com carbodiimida para aumentar a quantidade de carregamento de enzima. O método de imobilização da lipase *Candida rugosa* a dois tipos de esferas de quitosana foi realizado ativando-se os grupos hidroxilas da quitosana com agente de acoplamento.

Minteer e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre o efeito do grau de diacetilação sobre enzimas imobilizadas em quitosana modificada através da sua hidrofiliçidade. A quitosana é um polissacarídeo diacetilado formado da quitina que, ao longo da última década, tem sido empregada na modificação da hidrofiliçidade para induzir uma estrutura micelar. Estes polímeros micelares foram utilizados com várias finalidades, sendo uma a imobilização de enzimas. O estudo avalia o efeito que o grau de diacetilação tem sobre a modificação hidrofóbica e o peso molecular médio da quitosana e as conseqüentes alterações da atividade enzimática após a imobilização da glicose oxidase na estrutura micelar.

O trabalho demonstrou que as características físicas e as propriedades químicas da quitosana com a hidrofiliçidade modificada dependem do grau de diacetilação da quitosana.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

- Quitosana fornecida pela Sigma Aldrich, Brasil, com grau de desacetilação em torno de 80% e massa molar média igual a 161g/mol segundo o fabricante.
- Hidróxido de sódio (NaOH), fornecido pela VETEC.
- Tripolifosfato de pentasódio (TPF), VETEC fornecido pelo LCQUI/UENF.
- Polióxido etileno (PEO) de massa molar média igual a 1×10^5 g/mol, fornecido pela Sigma Aldrich.
- Copolímeros em bloco, poli(etileno-co-óxido de etileno), com 50 e 80% de PEO.
- Permanganato de potássio, fornecido pela VETEC
- Todos os solventes empregados são de grau PA.

3.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA

A modificação física de um polímero é comumente feita através da mistura física de dois ou mais polímeros, sem que haja ligação química entre eles. As blendas poliméricas são um tipo de mistura física sem ligação química.

A formulação de blendas poliméricas é muito interessante devido ao efeito cooperativo decorrente da mistura que resulta em melhoria das propriedades, em relação aos constituintes separados. Existem diversos processos de obtenção de blendas poliméricas, como citado na seção 2.9. Neste trabalho foi utilizado a técnica por evaporação do solvente (*casting*) .

3.2.1 – OBTENÇÃO DAS BLENDA POLIMÉRICAS

O método de formulação de blendas utilizado foi o de evaporação do solvente que consiste em espalhar a solução polimérica sobre uma superfície plana e então é permitida a evaporação total do solvente, um filme denso e homogêneo se forma.

3.2.1.1 - PREPARAÇÃO DA QUITOSANA

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas a partir da dissolução do material em solução aquosa de ácido acético a 1,0% (v/v). As soluções de quitosana foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após a dissolução do material, as soluções foram filtradas em placa de vidro sinterizado com tamanho de poro G1 (Merse), para a eliminação das impurezas insolúveis da quitosana. As soluções filtradas foram então desaeradas sob pressão reduzida.

Os filmes de quitosana com PEO, PE-b-80%-PEO, PE-b-50%-PEO e PE-b-PEO-COOH, foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e polímeros em relação (QUITOSANA/ Polímero) de 80/20. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

A silanização das placas utilizadas como moldes foi efetuada utilizando-se óleo de silicone aplicado com papel absorvente, de modo a recobrir uniformemente a superfície interna das placas, que foram então mantidas em estufa por duas horas a 200°C. As placas foram cuidadosamente lavadas com uma esponja macia umedecida com água e detergente (comercial) e imersas em água corrente por dois minutos. Após este procedimento, as placas permaneceram imersas em água destilada por 12 horas, sendo secas à temperatura ambiente antes de seu uso.

As soluções de quitosana ou quitosana/polímero foram vertidas nas placas de Petri, estas foram mantidas em dessecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M

por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

As membranas produzidas foram secas à temperatura ambiente sob prensagem entre duas folhas de papel de filtro, sendo, então, envoltas em papel vegetal e armazenadas à temperatura ambiente.

3.2.2 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLIÓXIDO ETLILENO

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas de acordo com metodologia citada anteriormente.

Os filmes de quitosana com PEO foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e PEO em relação (Q/ PEO) de 80/20. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

As soluções de quitosana ou quitosana/polímero foram vertidas nas placas de Petri silanizadas e, estas foram mantidas em dissecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

3.2.3 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLI(ETILENO - *co* - ÓXIDO ETILENO) E POLI(ETILENO - *co* - ÓXIDO ETILENO) MODIFICADO.

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas de acordo com metodologia citada anteriormente.

Os filmes de quitosana com PE-b-80%PEO, PE-b-50%PEO e PE-b-80%PEO-COOH previamente obtido por oxidação em meio básico do PE-b-80%PEO (Fontineles, 2006) foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e PE-b-80%PEO e PE-b-50%PEO em relação (Q/ Copolímero) de 80/20 m/m. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

As soluções de quitosana ou quitosana/copolímero foram vertidas nas placas de Petri previamente silanizadas e, estas foram mantidas em dissecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

3.3 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E BLENDAS

3.3.1 - CARACTERIZAÇÃO POR FTIV

Uma molécula pode absorver energia proveniente de radiação eletromagnética, sofrendo vários tipos de excitação como eletrônica, rotacional, mudança de *spin* e deformação de ligação, entre outras. A espectroscopia no infravermelho refere-se à radiação de excitação a números de onda entre 4000 e 600 cm^{-1} . A diferença de intensidade entre o feixe de referência e a do feixe transmitido mede a quantidade de radiação absorvida. Os números de onda de absorção relativos aos modos de vibração dependem da força da ligação química entre dois átomos, e a intensidade de absorção da diferença do momento dipolar nesta mesma ligação. Desta forma, é possível caracterizar a função química a qual pertence o composto.

A matéria é capaz de interagir com a energia proveniente da radiação eletromagnética, sofrendo vários tipos de excitação como eletrônica, rotacional, mudança de *spin* e deformação de ligação, entre outros.

A espectroscopia no infravermelho investiga a interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com a matéria. O FTIV será realizado no equipamento VARIAN 3100 FT-IR SCALIBUR SÉRIES disponível na Unidade de Caracterização Térmica do Instituto de Macromoléculas Eloisa Mano do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As amostras analisadas estão sob a forma de filmes. Os espectros serão obtidos em um intervalo de 4500 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4.0 cm^{-1} e 20 acumulações por espectro.

3.3.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O microscópio de força atômica permite ao usuário superar a limitação que a microscopia de tunelamento impõe em relação a amostras não condutoras. Também é possível analisar amostras em ambientes úmidos. Uma ponta de prova é posicionada em uma haste de material macio, que varre a amostra analisada. Um feixe laser incide sobre a parte posterior da haste e, após sofrer reflexão, é defletido em um fotodiodo com dois setores.

A diferença de intensidade da luz que alcança os dois setores é uma medida da deflexão do suporte e fornece um sinal que é enviado ao circuito eletrônico. A deflexão é então mantida constante durante a varredura. A varredura é feita com força constante entre a amostra e o suporte. A medida da força de arraste da ponta de prova sobre o substrato pode ser associada, por exemplo, com a força de adesão de células ao substrato. A aproximação da ponta à superfície analisada é menos delicada já que a ponta é suportada por um material macio e evitará dano à amostra (DESCOUTS *et al*, 1995).

As imagens foram obtidas em um AFM Multimode Nanoscope III scanning probe microscope Veeco Instruments, em atmosfera ambiente e temperatura controlada (21°C), usando modo contato intermitente. Será usada uma resolução de 256x256 linhas e scanner AS-12 ("E") de área de varredura de 10 x 10 µm e faixa vertical de 2,5 µm. Foram usados cantilever de fósforo dopado com silício de frequência de ressonância de 235-295 KHz, constante de mola de 20 a 80 N/m.

O modo contato intermitente permite obter imagens de superfícies mais irregulares como o caso da maioria dos materiais poliméricos o que não é permitido com o modo contato em que há uma aproximação muito grande entre sonda e amostra. Neste modo de análise a frequência de varredura será inferior a 1 Hz para garantir um bom sinal, capaz de gerar uma imagem superficial adequada do material analisado.

A rugosidade dos filmes foram medidas a partir das análises de AFM, a determinação da rugosidade de superfícies tem sido feita através das análises de microscopia de força atômica quando operado em modo de contato intermitente. As diferenças relativas à morfologia da superfície dos filmes foi avaliada através de três parâmetros de rugosidade. Esses foram, à diferença entre o ponto mais alto e mais

baixo para uma dada área, simbolizada pela letra z ; o desvio padrão do valor de z (R_q) para a área superficial analisada; e a rugosidade média (R_a) que representa o valor médio das alturas da superfície, relativas a um plano central que divide a mesma em duas porções de igual volume.

Na Figura 35a temos de forma ilustrativa o modo de varredura da ponta pela superfície, na Figura 35b a imagem gerada da superfície de uma amostra, além de um quadrado com comprimento lateral L , que representa a área que esta sendo analisada e na Figura 35c o perfil da linha destacada na Figura II.5b.

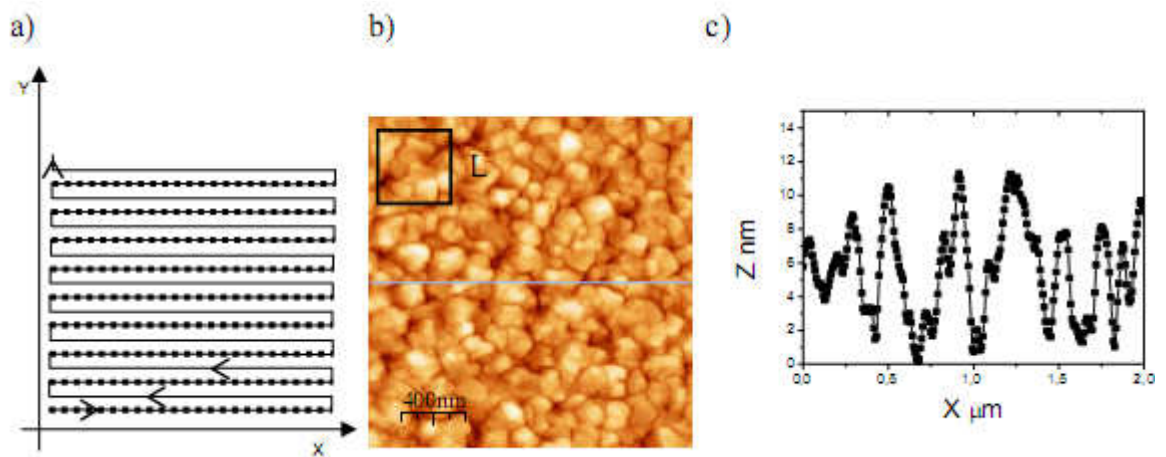


Figura 35- Esquema ilustrativo do modo de varredura do AFM para a obtenção dos parâmetros de rugosidade

O desvio padrão (R_q) é determinado através da Equação 8.

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum (z_i - z_m)^2}{N_p}} \quad (8)$$

Onde z_i é a altura no ponto i , N_p o número de pontos, z_m é a média das alturas. A rugosidade média (R_a) é determinada através da Equação 9.

$$R_a = \frac{1}{L_x L_y} \int_0^L \int_0^L |f(x, y)| dx dy \quad (9)$$

Onde $f(x, y)$ é o perfil superficial relativo ao plano central, e L_x e L_y são as dimensões da superfície nas direções x e y , respectivamente (Khayet *et al.*, 2004).

As medidas de rugosidade foram feitas pelo programa de computador NanoScope (R) III, fornecido pela fabricante do AFM utilizado nas análises. A área da superfície dos filmes avaliados foi de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, sem tratamento prévio da imagem.

3.3.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

Nessa técnica, um feixe colimado de elétrons varre a superfície da amostra. Os elétrons espalhados são coletados, gerando um sinal que é amplificado e usado para modular o brilho de um tubo de raios catódicos que é varrido simultaneamente ao feixe de elétrons. A imagem gerada é uma imagem ponto a ponto. Como a profundidade de campo é muito grande, essa técnica é muito utilizada em estudos topográficos.

Vários tipos de contrastes podem ser utilizados de acordo com a finalidade da análise. Na análise com contraste por elétrons secundários, são captados elétrons com baixa energia, oriundos da superfície da amostra. Essa particularidade permite a análise de detalhes retro espalhados, são coletados elétrons de maior energia, oriundos de uma profundidade maior da amostra. Esse contraste é fortemente dependente das espécies atômicas envolvidas. Isso faz com que essa técnica seja potencialmente usada na identificação de fases que não apresentam significantes diferenças morfológicas.

3.3.4- ANÁLISE DE PERMEABILIDADE POR GRAVIMETRIA

Sorção e difusão de gases e vapores orgânicos em polímeros têm grande importância tecnológica. Uma análise cuidadosa das propriedades de transporte pode tornar mais claros aspectos estruturais dos polímeros, sendo estes influenciados pela natureza do polímero, morfologia, natureza e densidade de ligações cruzadas, cristalinidade, tamanho da molécula do permeante, temperatura de preparação de amostras, entre outros fatores (Poley e *colab.*, 2005).

Em resumo, a permeabilidade pode ser definida como a quantidade de permeante atravessando um filme polimérico de espessura unitária, por unidade de área, por unidade de tempo e a uma determinada pressão de vapor. Sua unidade comumente encontrada na literatura é o Barrer: 10^{-10} [cm^3 (STP) $\text{cm cm}^{-2} \text{s cm Hg}^{-1}$] (Galego e *colab.*, 2002).

No caso de experimentos de permeação, um gás é introduzido em um dos lados da membrana a pressão constante. Considerando a magnitude das pressões, supõe-se que a pressão do outro lado da membrana é zero.

O equipamento utilizado é o *Halogen Moisture Analyzer* modelo *HR73* da *Mettler Toledo*. Este equipamento baseia-se na medida da perda de massa do solvente permeado através da membrana.

São utilizados para o experimento os seguintes materiais: anel de teflon, anel de borracha, lacre de alumínio e um frasco de vidro pequeno específico. O anel de teflon não permite o contato entre a membrana (filme polimérico) e o lacre de alumínio. O anel de borracha é colocado entre a membrana e o frasco, auxiliando o lacre de alumínio na vedação do sistema. (Figura 36)

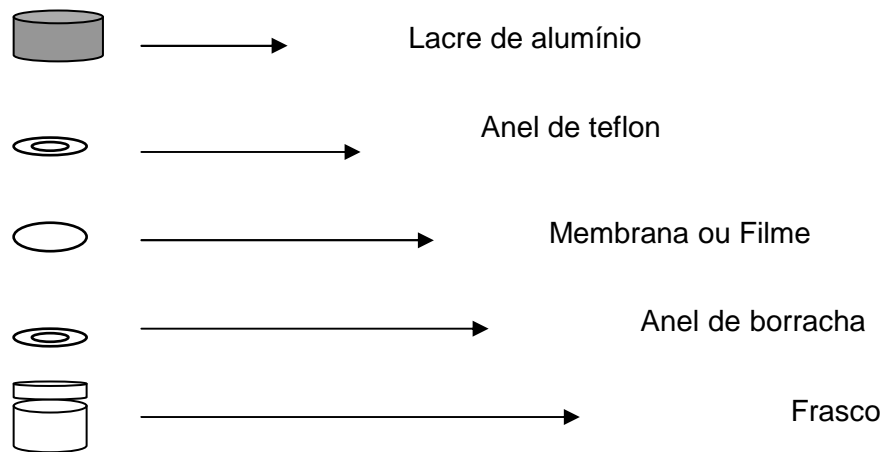


Figura 36 - Sistema tipo “copo de Payne” utilizado para medidas de transporte de massa.

A permeabilidade depende de um termo cinético relativo à difusão das moléculas através do filme e outro termodinâmico, relacionado ao calor de adsorção que influi na solubilidade das moléculas do permeante no polímero

A solubilidade depende da absorção das moléculas do permeante pelo polímero. A absorção aumenta com o aumento da interação entre o polímero e o permeante.

Os experimentos foram realizados utilizando-se água a uma temperatura de ensaio de 50°C, 55°C e 60°C. O coeficiente de permeabilidade foi determinado pela Equação (10).

$$\frac{Ql}{P_V A} = TDH \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad (10)$$

A equação foi adequadamente adaptada para trabalhar com vapor de água. Neste cálculo, deve-se considerar também a temperatura do ambiente, além da temperatura na qual a balança estabiliza o sistema (já considerada), e a umidade relativa do ambiente.

$$P = \frac{Ql}{A(R_1 - R_2)P_V} \quad (11)$$

Onde:

Q – coeficiente angular do ajuste linear do gráfico de permeabilidade;

L – espessura da membrana;

A – área da membrana;

R₁ – umidade no interior do sistema (copo de Payne);

R₂ – umidade no ambiente externo ao sistema;

P_v – pressão de vapor da água na temperatura do ambiente.

Uma informação importante que se pode obter através do coeficiente de permeabilidade é a energia de ativação, que pode ser obtida através do gráfico de log(P) versus 1/T, no gráfico a energia de ativação pode ser obtida a partir do coeficiente angular da reta de ajuste linear. (Poley, 2005)

3.3.5 - CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA

O grau de miscibilidade da região amorfa das blendas formuladas será avaliado através do comportamento termo-mecânico através da técnica de análise dinâmico-mecânica (DMA). A análise de DMA mede de forma separada o comportamento mecânico sob o efeito de tempo e temperatura da fase cristalina e amorfa do polímero (Lucas *et al*, 2001). Este ensaio permite a determinação da temperatura de relaxação da transição vítrea do polímero devido à análise em separado das modificações microscópicas da fase amorfa.

As propriedades dinâmico-mecânicas de materiais são definidas a partir do comportamento do material frente a deformação ou à aplicação de tensão oscilatória de pequena amplitude. Normalmente submete-se o material à uma deformação senoidal. Se o comportamento visco elástico é linear, material responderá à deformação com uma tensão também senoidal, porém defasada de um ângulo δ em relação à deformação devido à dissipação de energia.

Das misturas obtidas, a caracterização do grau de miscibilidade pela fase amorfa, será realizada através de corpos de prova retangulares com dimensões de 22,5 x 8,2 x 0,21 mm ($\pm 10\%$). A mesma análise será realizada também com os filmes de 100%CH. As análises serão realizadas em um TA Instruments DMA 2980 multi-freqüência, com *clamp* tipo garra, freqüência de 1 Hz, taxa de aquecimento de 4°C/min, na faixa de temperatura de -90 a 100°C, utilizando nitrogênio como gás de resfriamento na unidade de caracterização térmica e de superfícies do SEPOL/LAMAV/UENF

3.3.6 – CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Desde que os raios X são de natureza eletromagnética, eles devem ser difratados em planos cristalinos se a distância entre os planos for comparável ao comprimento de onda dos raios X. Em cristais, os quais possuem ordem tridimensional, o arranjo dos planos na rede faz com que a difração ocorra. Os raios emitidos de diferentes planos cristalinos interagem sistematicamente entre si, fornecendo reflexões discretas. De acordo com Bragg, a posição da reflexão é dada pelo comprimento de onda λ do feixe de raios X incidente, pela distância d entre os planos paralelos e pelo ângulo θ entre o raio incidente e o plano da rede ou seja:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (12)$$

em que n é a ordem da reflexão. Em polímeros, a reflexão de maior intensidade é comumente encontrada para $n = 1$. Se os planos dos diferentes cristalitos são aleatoriamente distribuídos uns em relação os outros (como em pós-cristalitos), então o raio monocromático encontrará partículas suficiente para produzir todas as posições de reflexões que preenchem as condições de Bragg. Desde que haja

muitos cristalites pequenos com diferentes orientações de planos cristalinos, será obtido em sistema de cones coaxiais de raios X com um vértice no centro da amostra. Uma seção vertical deste sistema de cones sobre um plano fotográfico fornece uma série de currículos concêntricos, ou setores de currículo, no caso de um filma cilíndrico.

Polímeros amorfos expostos aos raios X apresentam sobre uma placa fotográfica anéis fracos sobre um *background* forte e difuso. Esses máximos fracos também denominados de halos são originários de uma “ordem” local em polímeros amorfos. Polímeros parcialmente cristalinos também mostram estes halos, mas, em adição mostram em anéis fortes de reflexões cristalinas.

A origem do *background* difuso é devida, principalmente ao espalhamento do ar, com contribuições pequenas do movimento térmico nos cristalites, e ao espalhamento Compton. O espalhamento Compton é um efeito de espalhamento incoerente e quantizado que ocorre igualmente em todas as substâncias independentemente de seu estado físico.

A intensidade das reflexões e dos halos geralmente é interpretada de acordo com um modelo de duas fases, como por exemplo, o conteúdo das fases cristalinas amorfas. Para efetuar essa análise deve-se subtrair a intensidade do *background* difuso

Em análises de raios X, podem-se utilizar vários tipos de detectores sensíveis, como, por exemplo, um contador proporcional. Este sistema detecta e conta os fótons de raios X separados em um feixe difratado. Com este método, registra-se a intensidade versus o ângulo 2θ diretamente.

Cada um dos métodos (fotográfico e difratométrico) tem suas vantagens e desvantagens. A técnica fotográfica registra de uma só vez o padrão inteiro de difração e é excelente para localizar inicialmente máximos de difração, mas é ruim na produção de dados quantitativos, devido a problemas relacionados à leitura fotométrica dos dados. Já o contador difratométrico fornece resultados quantitativo diretamente, mas pode ocorrer perda de pontos de difração, o que permitiria o estabelecimento das condições adequadas para a obtenção do difratograma.

Para o estudo de materiais poliméricos por difração de raio X, há duas regiões de interesse, são elas:

1 – A região dos altos ângulos, que corresponde aos ângulos 2θ de Bragg até 30° - 50° .

2 – A região dos baixos ângulos, que corresponde aos ângulos 2θ de Bragg até 1° .

Os resultados que podemos obter a partir das técnicas de raios X de alto ângulo são:

1 – *Quantidades relativas das fases cristalina e amorfa no polímero*: para determinar o conteúdo amorfo, inicia-se a análise a partir do ângulo mais baixo de espalhamento, uma vez que as reflexões cristalinas são quase ausentes nesta região. Por outro lado, a difração cristalina apresenta normalmente um mínimo (intensidade máxima) entre dois máximos, se estes estiverem separados por mais de 3° . Para a análise, assume-se que a intensidade difratada é proporcional ao conteúdo cristalino e que a intensidade dos halos amorfos é proporcional ao conteúdo amorfo (em um ângulo ou uma faixa de ângulos específicos). Os fatores de proporcionalidade dependem também do ângulo de observação e de uma função específica. Estes podem ser determinados, por exemplo pela comparação com amostras completamente cristalinas ou amorfas. Amostras amorfas podem ser obtidas pelo resfriamento rápido (nem sempre possível) do polímero fundido ou pelo estudo direto por raios X da amostra no estado fundido. A intensidade das reflexões será, então, uma medida da cristalinidade.

2- *Tamanho e perfeição dos cristais*: à medida que os cristais expostos aos raios X se tornam menores ou menos perfeitos, os picos difratados ou as linhas tornam-se mais largos. Infelizmente, em muitos casos, não é possível diferenciar as duas causas de alargamento de linha ou pico em amostras poliméricas, a menos que duas ou mais ordens de reflexão (de planos com índices de Miller (110) e (220), por exemplo) possam ser observadas. Na ausência de ordens múltiplas, é praticamente impossível identificar a origem do alargamento dos picos, a menos que outra informação ajude a tomar a decisão correta. Além disso, os cristais devem estar presentes acima de uma certa concentração mínima, caso contrário, a intensidade da reflexão correspondente não será obtida por este método.

Para obter difrações de raios X discretas, é necessário, ainda que se tenham concentrações suficientemente altas de regiões ordenadas bidimensionais e que estas se estendam por distâncias de, pelo menos, 2 a 3 nm. Este fato torna suspeito o cálculo do tamanho dos cristais a partir a largura das reflexões para macromoléculas. As posições das unidades monoméricas de cadeias individuais são, de fato, levemente deslocadas umas em relações às outras na cristalização por

razões cinéticas, isto é, partes da cadeia são fixadas em estados de ordem antes que toda a cadeia adquira a posição ideal na rede.

Portanto, este efeito provoca variações locais na constante da rede que por sua vez, podem promover o alargamento dos picos.

3 – *Orientação*: quando uma amostra se torna cada vez mais orientada, os anéis de difração dos raios X se transformam em arcos, os quais podem se tornar cada vez mais estreitos e se apresentar na forma de pontos. Como resultado da orientação tanto em filmes como em fibras, temos que o eixo molecular é alinhado paralelamente à direção do estiramento (chamado meridiano) e o equador corresponde à direção perpendicular a ela. O cálculo da orientação cristalina é bastante complexo.

4 – *Ordem de empacotamento*: as reflexões equatoriais em um diagrama fornecem informação a respeito do empacotamento entre as cadeias, da regularidade e da ordem lateral de longo alcance no cristal, além da simetria da célula unitária.

Os filmes obtidos a partir das blendas de quitosana, foram estudados pela técnica de difração de Raios X a partir da deposição do filme no porta amostra utilizando difratômetro marca SHIMADZU modelo XRD 7000 (Figura 37). Os dados de difração foram coletados de 5° a 40° (2θ), sendo utilizados com os seguintes parâmetros de medida de tensão de 40 kV, corrente no filamento de 30mA, foi usada radiação de cobre, com velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$.



Figura 37 - Difratômetro marca Shimadzu modelo XRD 7000, utilizado para as análises.

3.3.7 – CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas fotoacústicas como parte da caracterização das propriedades térmicas das blendas em colaboração com o grupo de pesquisa “Fenômenos Fototérmicos” do Laboratório de Ciências Físicas (LCFIS) da própria Universidade (UENF).

A técnica fotoacústica pertence a uma família de técnicas fundamentadas no chamado efeito fototérmico. Este efeito consiste na medida da flutuação da temperatura de um meio devido a absorção de energia radiante modulada. A variação de temperatura da amostra é detectada indiretamente por meio de um microfone de eletreto.

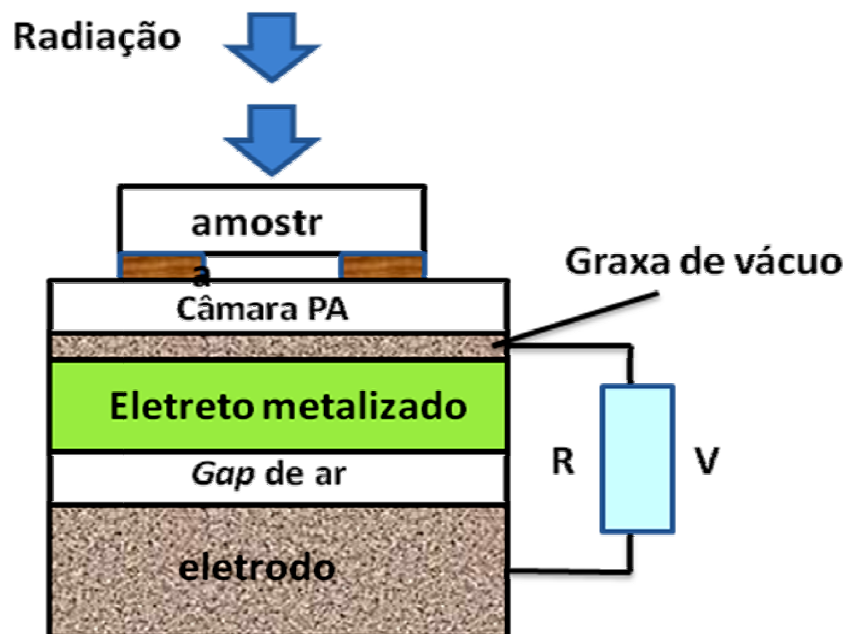


Figura 38 - Esquema do microfone de eletreto.

De uma forma geral existem três mecanismos de geração de sinal acústico: difusão, expansão e termoelástico.

- *Mecanismo de difusão:*

A energia térmica gerada na superfície exposta à incidência de uma radiação luminosa modulada se difunde pela amostra até atingir a superfície oposta que está voltada para o interior do microfone. Ao atingir esse lado da amostra o calor é transferido, em forma de energia cinética, para as moléculas contidas no volume delimitado pela amostra e o microfone, aumento modulado da energia cinética, representa um aumento modulado da pressão dentro desse volume, (som). (Figura 38)

- Mecanismo de Expansão:

A expansão e contração volumétrica da amostra devido ao acúmulo de energia térmica gerado pela incidência de uma luz modulada e pode resultar numa alteração do volume da câmara fotoacústica.

- Mecanismo Termoelástico:

Dependendo do tipo de material a ser caracterizado (baixa difusividade térmica), ocorre um gradiente de temperatura na direção z. Tal gradiente é responsável por uma expansão maior da amostra no lado voltado para incidência de luz em relação ao lado que está fixo no microfone. Assim, uma vez que a luz incidente está modulada, ocorre a deflexão elástica periódica da amostra sobre o microfone e assim a geração do sinal acústico. Esse é o mecanismo predominante em materiais poliméricos.

3.4 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA - NÚCLEO

3.4.1 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMAGNETITA (NÚCLEO)

Para a preparação das microcápsulas de magnetita (Fe_3O_4), foi empregado método de co precipitação (Yang et al.,2008). No reator, foi colocados 50 mL de cada uma das soluções aquosas de sais de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5M e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,75 M) acrescidos de 50 mL de água também deionizada, resultando num volume total de 150mL.

Sob atmosfera de nitrogênio e temperatura de 60°C, serão adicionados 13 mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônia 28% w/w. Após a adição, deve-se observar a mudança de cor para uma coloração escura.

O precipitado foi isolado por decantação magnética e lavado 3 vezes com água destilada para eliminar o excesso de NH_3 . Por fim, as microcápsulas foram secas à temperatura ambiente e vácuo e, após macerar e peneirar (100mesh), as mesmas serão caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando o equipamento Shimadzu, modelo SSX-550, disponível no LAMAV/CCT, para a análise morfológica das microcápsulas magnéticas.

3.4.2 – PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE *SPRAY-DRYING*.

Várias técnicas de microencapsulamento são descritas na literatura. Grande parte delas são baseadas no uso de solventes orgânicos para preparação das microcápsulas, tais como separação de fase orgânica, secagem a jato *spray drying*, evaporação de solvente.(Breitenbach et al, 2000)

O *spray drying* é a técnica mais utilizada nas indústrias química (plásticos, cerâmicos, fertilizantes e pigmentos), alimentação (leite em pó) e farmacêutica (extratos de plantas, materiais naturais e excipientes). O objetivo desta técnica é obter um produto seco, mais concentrado e de fácil conservação ou de manuseio do que os processos de extração de soluções. Pode-se assumir que a secagem quase instantânea do produto evitará ao máximo sua hidrólise, oxidação e sua decomposição.

A preparação de microcápsulas por *spray drying* oferece uma série de vantagens: menor dependência da solubilidade do agente ativo do que os métodos de evaporação do solvente, as condições de processamento são mais suaves e adequadas para a formulação de microcápsulas carregadas com proteínas e peptídeos, é um processo contínuo de fácil alimentação e de maneira gradual.

Na técnica de *spray drying*, um líquido na forma de *spray* é secado e coletado, sendo o resíduo o produto final. A técnica de *spray drying* é utilizada em várias indústrias, tais como na indústria de alimentos e farmacêutica na produção de materiais plásticos e cerâmicos. Ela é adequada para materiais que sejam sensíveis ao calor, devido ao processo de secagem ser rápido o material não precisa ser submetido a altas temperaturas para concluir a secagem dentro de um tempo razoável.

O processo de *spray drying* pode ser dividido em três etapas:

- Atomização do líquido por um redemoinho, pressão ou atomizador pneumático e entradas deste em câmara de secagem.
- Secagem das gotas do *spray* por um fluxo de gases aquecidos, produzindo um resíduo na forma de pó.
- Remoção do pó do meio de secagem, usualmente por meio de um separador ciclone.

A Figura 39 mostra o diagrama de blocos para o processo de pulverização das microcápsulas pela técnica de *spray drying*.

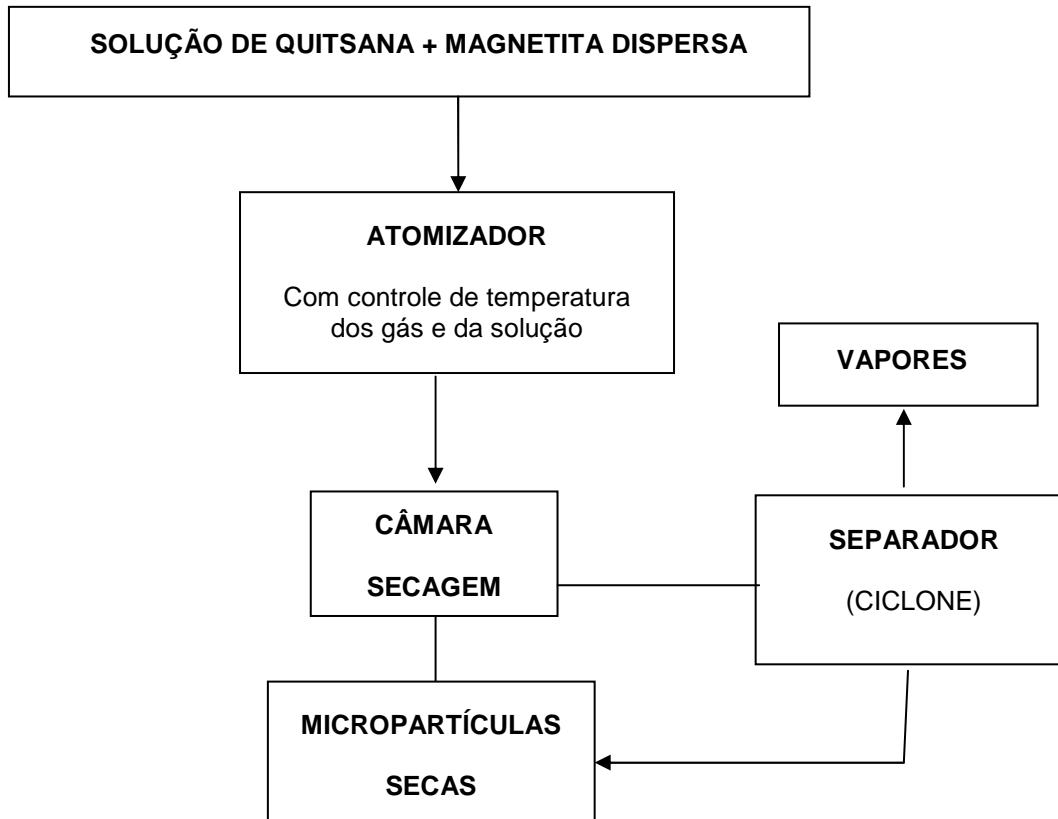


Figura 39 - Processo para formulação das microcápsulas pela técnica de secagem por pulverização (*spray drying*).

As microcápsulas foram obtidas utilizando o equipamento SD-04 *Laboratory Scale Spray Drier*, disponível no setor de polímeros (SEPOL).

3.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM O NÚCLEO DE NANO-MAGNETITA

3.5.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias de varredura foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu SSX-550, disponível no LAMAV/CCT para a nanomagnetita sintetizada e para as microcápsulas formuladas para determinar sua morfologia e tamanho das partículas. As microcápsulas foram depositadas num porta-amostra com fita adesiva de grafite e recobertas com um filme de ouro de 20 nm para não sofrerem descargas durante a análise.

3.5.2 – 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 μ g, nos termopares de platina de 0,001 $^{\circ}$ C, disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL).

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

O gás hélio foi 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 N₂, 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.

3.5.2 – POROSIDADE

As microcápsulas foram testadas com objetivo de caracterizar a porosidade. Para a quitosana e outros biopolímeros, a porosidade pode ser influenciada pelos seguintes fatores: a rota de preparação e as modificações químicas. Na etapa de preparação, os parâmetros mais importantes foram a concentração da solução de quitosana e a concentração da solução de NaOH (Beppu e Santana, 1999). Com objetivo de maximizar os valores de porosidade, foram usados altos valores de concentração, aproximadamente 2,0 %, em massa, de quitosana e 1 M de NaOH.

O nome BET, da técnica de adsorção de gás, foi designado em homenagem aos três pesquisadores que desenvolveram a teoria de adsorção de gás para efetuarem medidas de área superficial específica Brunauer, Emmett e Teller, que trabalharam com a isoterma de adsorção de multicamadas de gás de forma similar a Langmuir, que equacionou a monocamada adsorvida. A isoterma é a relação entre a quantidade de gás adsorvido e a pressão do gás a certa temperatura.

A adsorção de gás ocorre em qualquer sólido, sendo dependente da temperatura, pressão e superfície. A adsorção física dos gases é promovida por forças do tipo Van der Waals. O equilíbrio da adsorção física do gás é rápido, pois não envolve energia de ativação e é um processo reversível.

Para a realização das medidas para as microcápsulas formuladas foi utilizado o equipamento de adsorção de gás Autosorb-1 da Quantachrome Instruments pertencente ao LCQUI/UENF.

Para a análise, o material foi secado em estufa (para retirada de umidade) e pesado para que, assim, possa ser colocado no portas-amostra, que será acoplado ao equipamento. Será realizado um pré-tratamento a 90°C por 24h para posteriormente, realização das medidas de área superficial específica e de porosidade.

A área superficial total das amostras submetidas a esta análise foi calculada pelo equipamento através do nitrogênio adsorvido (m^2), a partir do volume de gás adsorvido (V) em função da pressão relativa (P/P_0). A área superficial foi medida e dividida pelo peso total da amostra testada (g), a fim de se obter a área superficial específica ($m^2 \cdot g^{-1}$).

3.5.3 – MEDIDAS DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETÔMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE

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 (Bordini, 2006)

As propriedades magnéticas foram estudadas utilizando um magnetômetro Vibrational OXFORD VSM, Modelo 3001(Figura 40) com um campo magnético com eletroímã máximo de 1,6 Tesla e sensibilidade de 10^{-5} emu, que serão realizados no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), todos serão realizados em temperatura ambiente, usando um campo externo de 2 KOe para varrer o campo na origem da curva inicial de magnetização.



Figura 40 - Magnetômetro de Amostra Vibrante marca OXFORD VSM, Modelo 3001 utilizado para as análises

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados pretendidos neste trabalho são o desenvolvimento de um suporte com propriedades magnéticas a partir da quitosana para a imobilização de enzimas com vista a sua utilização na produção de biodiesel.

Com este propósito numa primeira parte deste capítulo são apresentados e discutidos resultados referentes a caracterização da quitosana e alguns materiais preparados a partir da quitosana modificada procurando materiais com morfologia e propriedades apropriadas que possam vir a ser utilizados na formulação de um suporte para a imobilização de enzimas com propriedades magnéticas.

4.1 – CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA

Os filmes densos formulados com a técnica de evaporação do solvente (*casting*) a partir da quitosana foram caracterizados e utilizados como referência na avaliação dos materiais modificados.

4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QUITOSANA

A Figura 41a) mostra a micrografia de superfície da quitosana obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes da neutralização com NaOH. Observa-se uma superfície aparentemente lisa e contínua caracterizando o filme como denso.

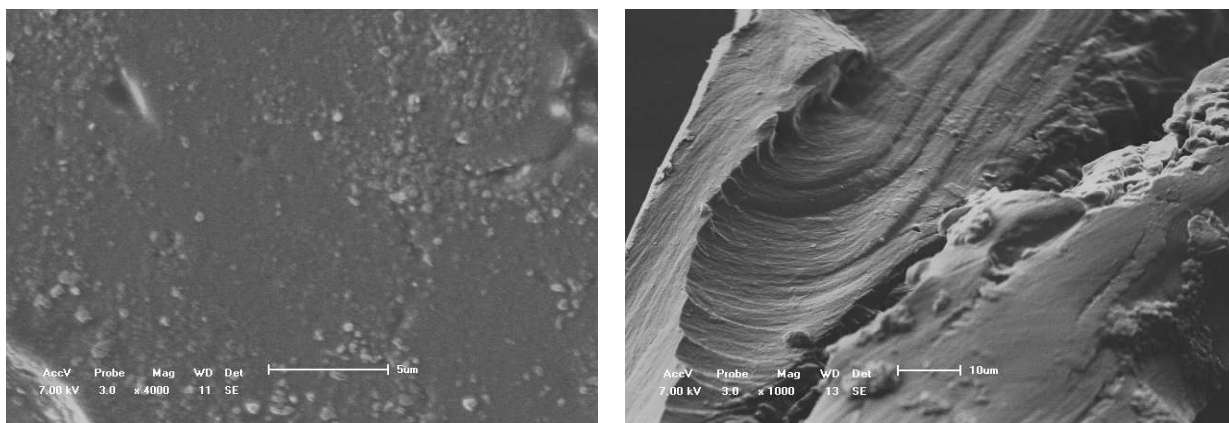


Figura 41 - Imagens MEV da superfície do filme de quitosana (a) e da seção transversal do filme de quitosana (b).

Na Figura 41(b) a seção transversal do filme de quitosana, apresenta-se contínua, com aspecto denso, não observando-se poros no volume.

As imagens de superfície do filme de quitosana por microscopia de força atômica mostradas nas Figuras 42 e 43. permitem associar a superfície a existência de um certo nível de rugosidade relativamente regular ($R_a = 1,323 \text{ nm}$)(Figura 42).

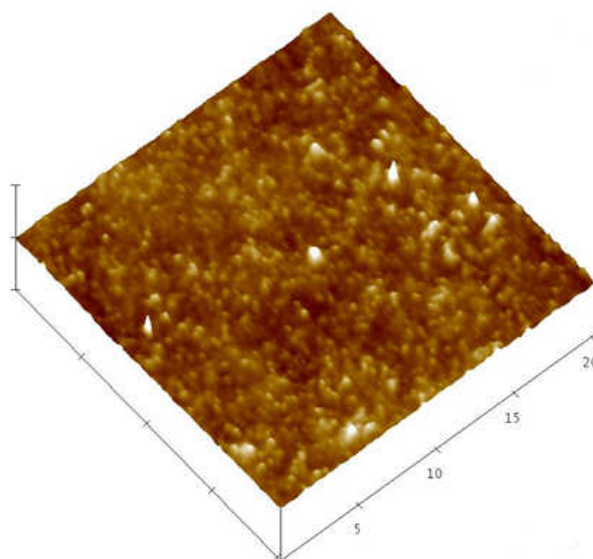


Figura 42- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de quitosana com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

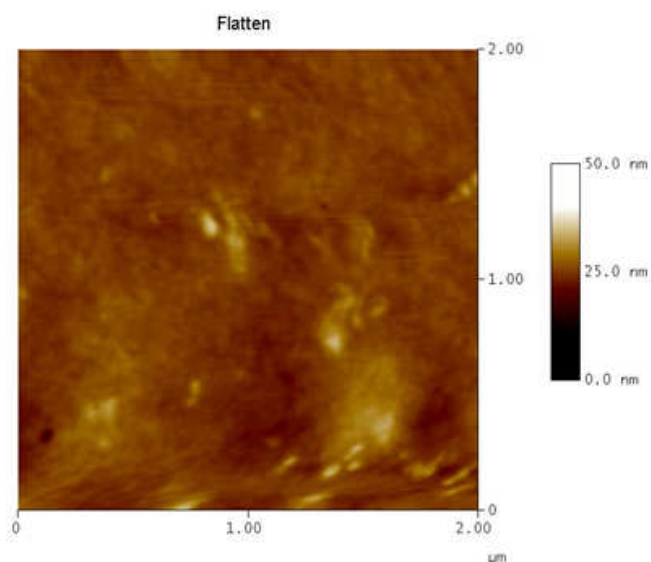


Figura 43 - Microscopia de força atômica mostrando morfologia da superfície do filme denso de quitosana com 2 μ m x 2 μ m de área.

4.1.2 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DE QUITOSANA.

Os filmes poliméricos densos foram submetidos à análise por difração de raios X. O difratograma do filme de quitosana (Figura 44) apresenta no eixo 2θ sinais a 10,5°, 19,9°, 22,2° e 28,0°, (Ritthidej,2002) correspondendo a

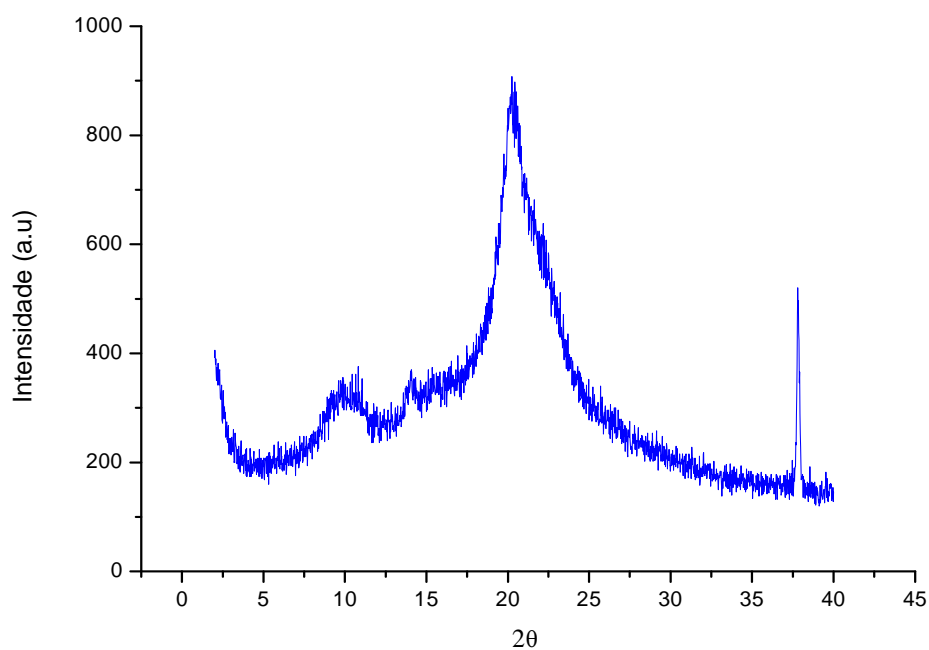


Figura 44- Difratograma do filme de quitosana neutralizado.

Nesta faixa para 2θ entre 10° - 40° , a tendência a formação de bandas largas em lugar de sinais finas são consequência da fase amorfa, originando um difratograma característico de um polímero semicristalino (SVETLANA, 2008). O filme de quitosana apresentou 56,8% de cristalinidade.

4.1.3 – ESTRUTURA DA QUITOSANA: ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.

O espectro infravermelho (ATR) da quitosana (Figura 45) está caracterizado pela presença de uma sinal larga com máximo em torno de 3420 cm^{-1} , atribuída à deformação axial do grupo O-H associado a outros grupos polares através de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares.

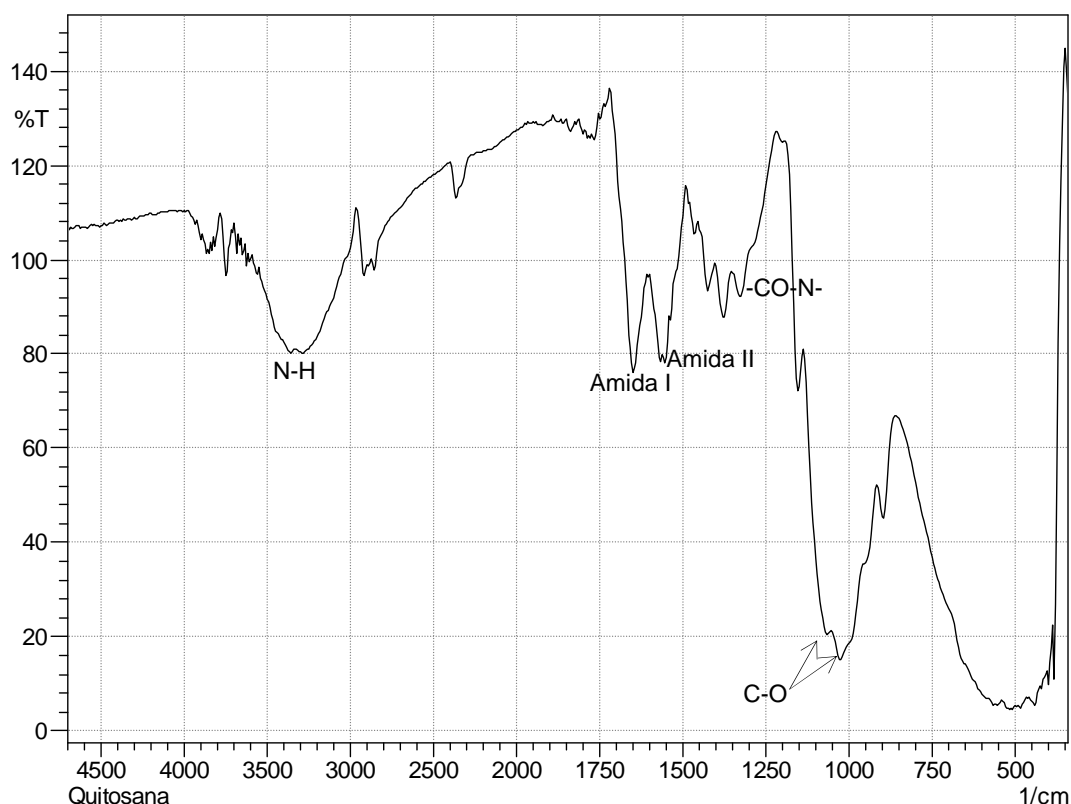


Figura 45 - Espectro de infravermelho (ATR) da quitosana.

Na região, próximo a 3300 cm^{-1} , também tem lugar a deformação axial N-H, normalmente obscurecida pela formação de pontes de hidrogênio com os grupos

OH. Sinais característicos são a 1650 cm^{-1} , correspondente a amida I, 1560 cm^{-1} , relacionada a amida II, 1070 e 1030 cm^{-1} , devido ao estiramento C-O, 1314 cm^{-1} devido ao grupo -CO-N-. O sinal intenso entre 800 e 1200 cm^{-1} está relacionado com os anéis piranosídicos.

4.1.4 – COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE DA QUITOSANA.

Foram realizadas medidas de coeficiente de permeabilidade a água dos filmes de quitosana em diferentes temperaturas (50°C , 55°C e 60°C), utilizando uma técnica termogravimétrica conforme descrito na metodologia.

O objetivo desta determinação é avaliar o impacto da modificação na permeabilidade a vapores de água e sua possível correlação com as propriedades do suporte catalítico, estes coeficientes de permeabilidade não estão disponíveis na literatura.

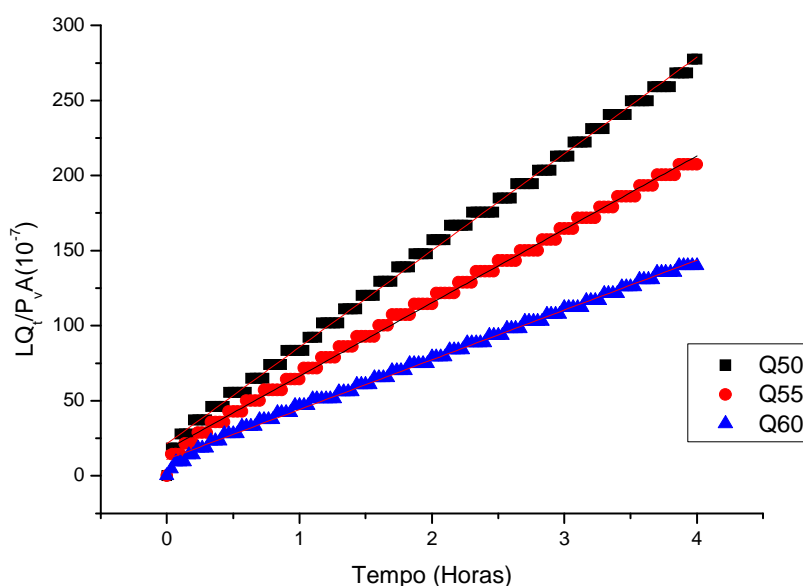


Figura 46 - Curva de tempo de retardo para o filme de quitosana utilizando água como permeante a diferentes temperaturas.

A solubilidade do vapor na matriz para o filme de quitosana nas temperaturas de 50° e 60° se modificam sensivelmente isto significa que provavelmente ambas

estão governadas pelas interações tipo ponte hidrogênio e energia envolvida é da mesmo ordem de grandeza.

4.2 – MODIFICACAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: BLENDS

4.2.1 – MORFOLOGIA DAS BLENDS.

As propriedades da quitosana podem ser modificada a partir da formação de blends que possam vir modular especificamente o balanço hidrofóbico/hidrofílico, cristalinidade, propriedades mecânicas e de transporte de massa as quais devem influenciar na efetividade do suporte catalítico.

Foram utilizados como polímeros modificadores o polióxido de etileno (PEO) e copolímeros deste com o polietileno.

O filme preparado com a blenda Q/PEO (80/20) m/m (Figuras 47(a) e (b)) possui uma superfície discretamente rugosa (a).

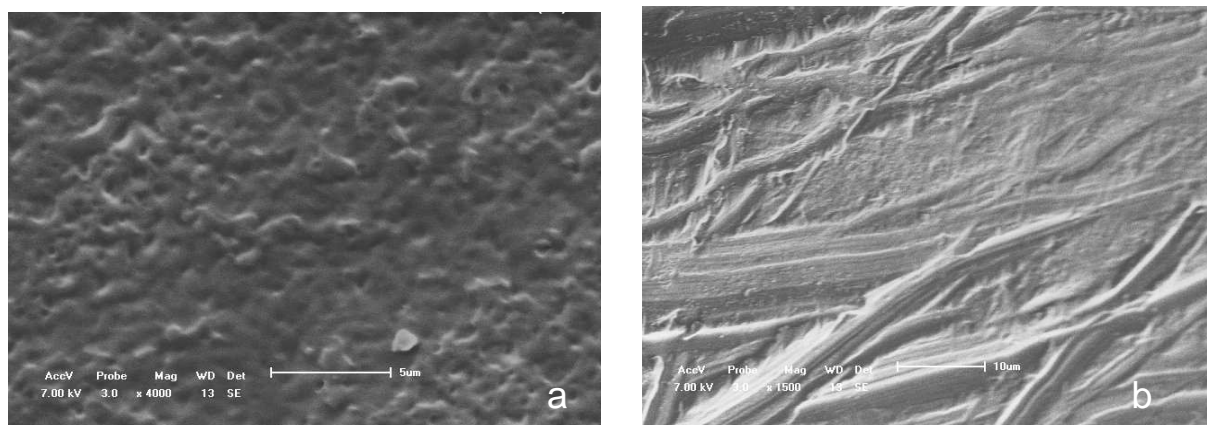


Figura 47 – Imagens de MEV: (a) Superfície e (b) Seção transversal no filme de Q/PEO (80/20).

Essa alteração na rugosidade da superfície do filme em relação ao filme de quitosana (Figura 41) pode estar relacionada à solubilização parcial do PEO, durante a neutralização e lavagem do filme, si consideramos que não foram observadas nos filmes de quitosana após neutralização devido a possível formação de vazios após

neutralização (AMIJI, 1995). Na Figura 47(b) a seção transversal do filme apresenta um aspecto de fibras entrelaçadas imersas numa matriz densa.

As imagens de AFM, para esta blenda de Q/PEO (Figuras 48 e 49), mostram que a adição de PEO na preparação da blenda origina certamente um filme com morfologia mais irregular, rugosa, ($R_a = 59,438 \text{ nm}$) que o da quitosana (Figura 41).

A imagem do filme (Figura 48) permite destacar a existência de “poços” mais profundos. A conclusão, provavelmente a mais relevante, é que não se observa a segregação da fase de PEO ou seja, nas proporções utilizadas a mistura é homogênea.

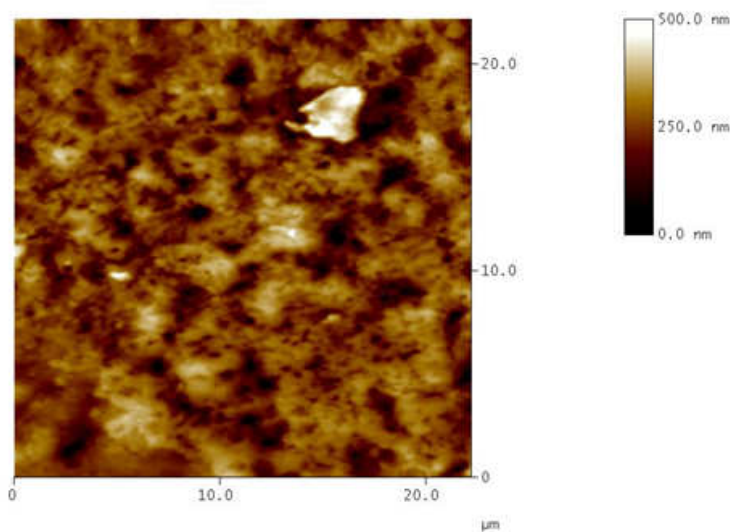


Figura 48 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

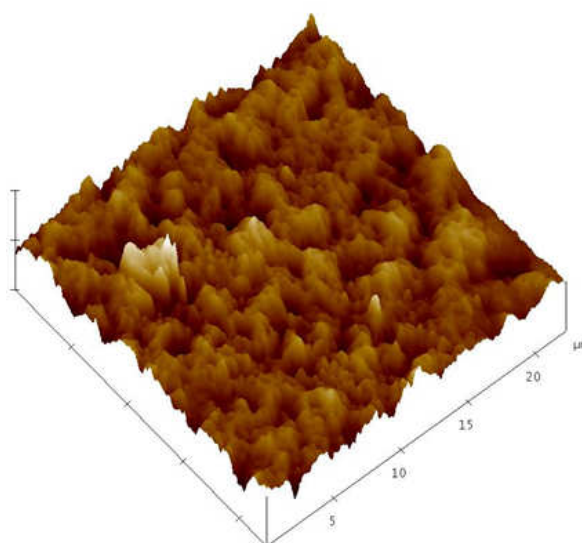


Figura 49 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PEO com $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ de área.

Para a mistura de quitosana/PE-b-80%-PEO (80/20) m/m, os filmes preparados apresentam uma superfície, Figuras 50(a) e (b), aparentemente mais lisa que a observada para a blenda Q/PEO com a presença de defeitos em sua superfície entretanto a principal diferença se observa na seção transversal, extremadamente regular e de aspecto microporoso.

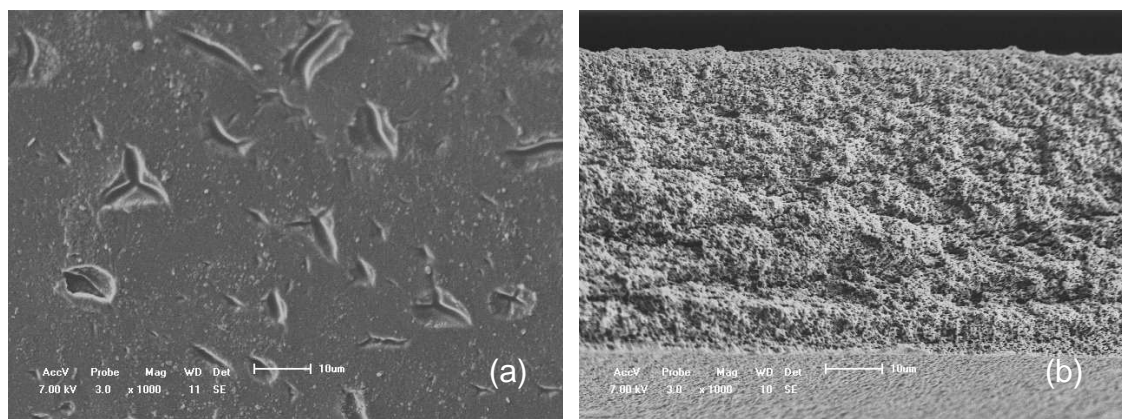


Figura 50- Imagens de MEV: (a) superfície e (b) seção transversal do filme de Q/ PE-B-80%-PEO (80/20).

A microscopia de força atômica destes filmes (Figuras 51 e 52) da blenda Q/PE-b-80%PEO indicam que a superfície é mais rugosa ($R_a = 53,340$ nm) que a do filme de quitosana.

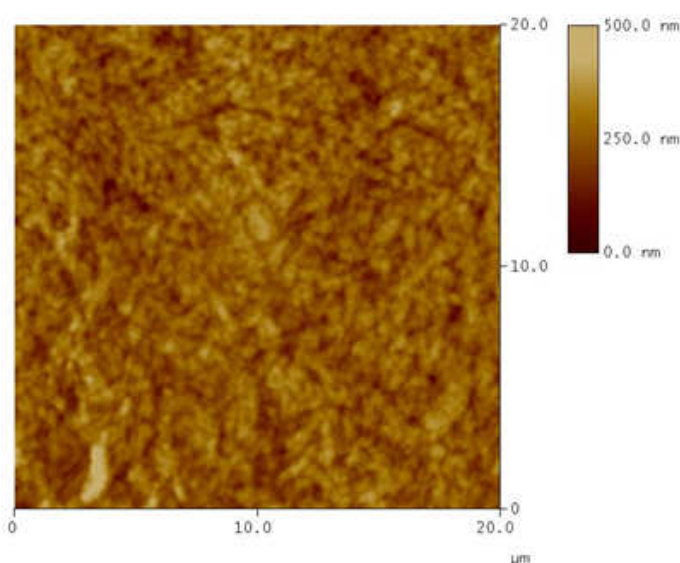


Figura 51 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.

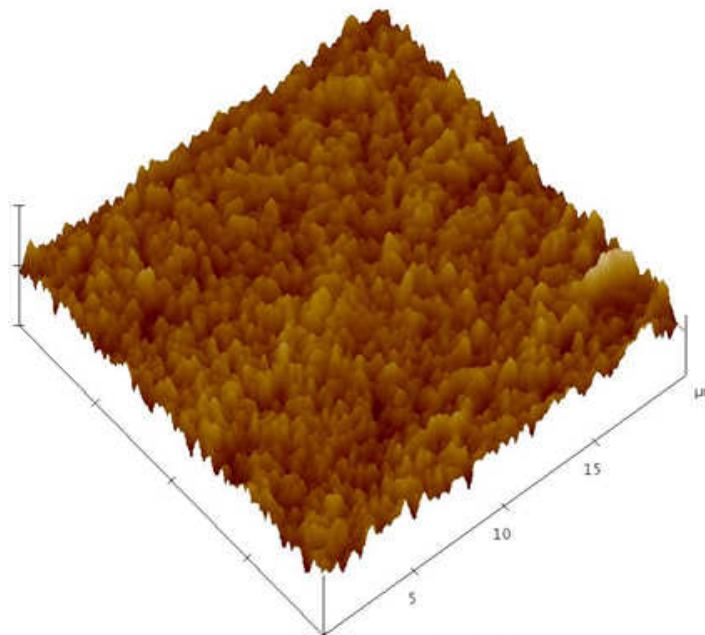


Figura 52 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20 μ m x 20 μ m de área.

Uma vez que para efeitos de análises do impacto da presença do PEO na morfologia das blendas, analisamos a morfologia de blenda Q/PE-b-50%-PEO (80/20) m/m que apresenta a menor contribuição de PEO à mistura (Figura 53) pode-se observar uma menor rugosidade quando comparada com a blenda Q/PEO (Figura 48).

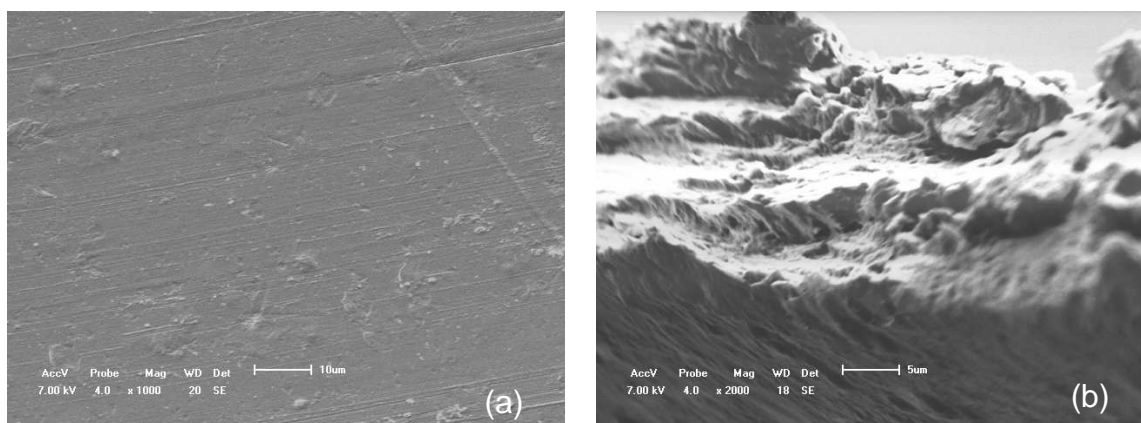


Figura 53 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-B-50%-PEO (80/20) e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-50%-PEO.

As Figuras 54 e 55 mostram as imagens de superfície e topográfica, respectivamente, dos filmes da blenda Q/PE-b-50%PEO. A adição do copolímero com 50%PEO na preparação da blenda origina realmente uma redução da

rugosidade ($R_a = 93,409$ nm) comparada com a blenda com maior conteúdo de PEO (Q/PEO, Figura 48-49).

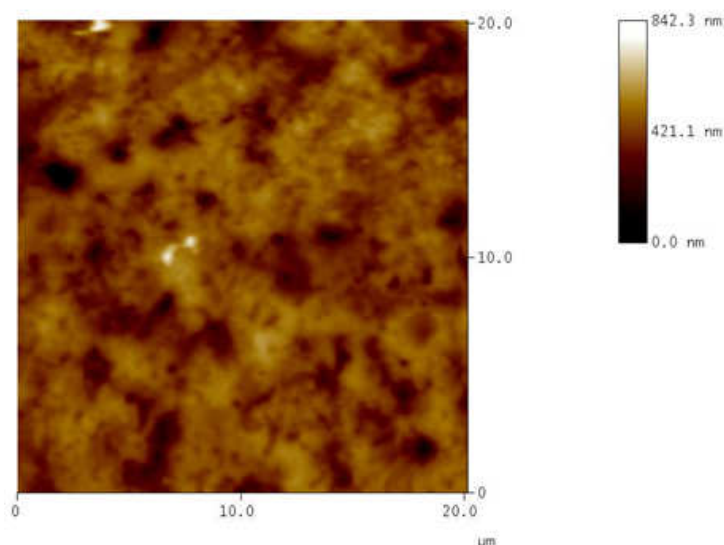


Figura 54- Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

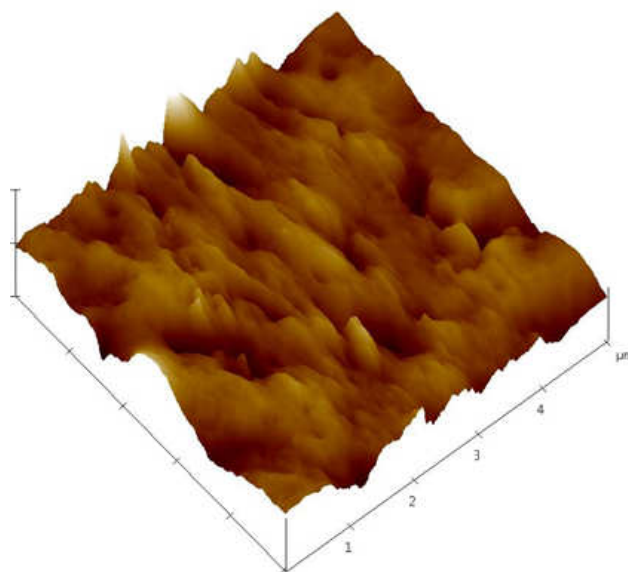


Figura 55- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

A adição do copolímero modificado PE-b-80%PEOCOOH na mistura com a quitosana (80/20) introduz a possibilidade de uma maior interação entre as fases proveniente da existência dos agrupamentos COOH no copolímero e o NH_2 na quitosana e assim mudanças mais acentuadas nas propriedades da blenda principalmente no referido a mudanças no balanço hidrofóbico/hidrofílico do suporte.

No filme da blenda Q/PE-b-80%PEOCOOH (Figura 56), se observam a presença de bolhas que não forma observadas no filme da quitosana provavelmente devido ao efeito do banho de NaOH sobre a fase PE-b-80%PEOCOOH e a contribuição de um possível efeito de aeração do filme.

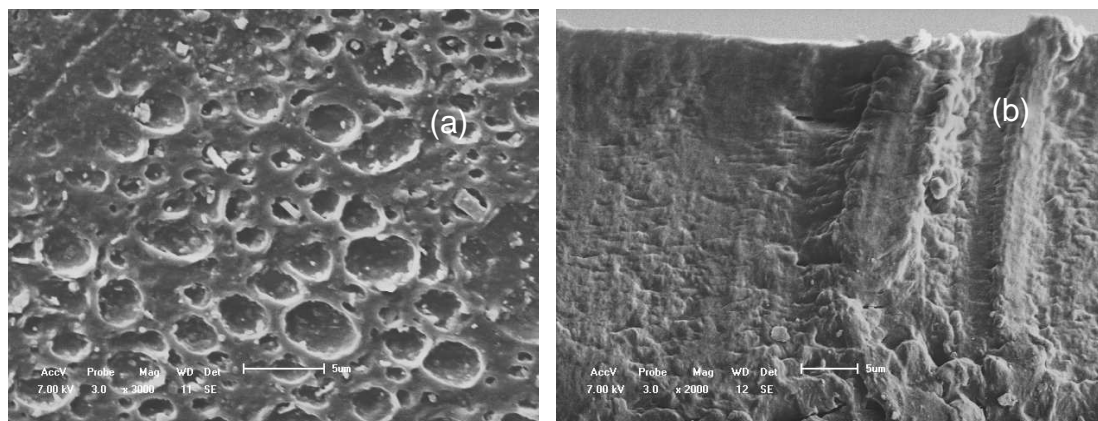


Figura 56 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-b-PEO-COOH e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-PEO-COOH.

As imagens de superfície e topográfica, Figuras 57 e 58 respectivamente, do filme da blenda Q/PE-b-80%PEOCOOH evidenciam a existência de uma topografia mais irregular que as blendas analisadas anteriormente e a quitosana pura.

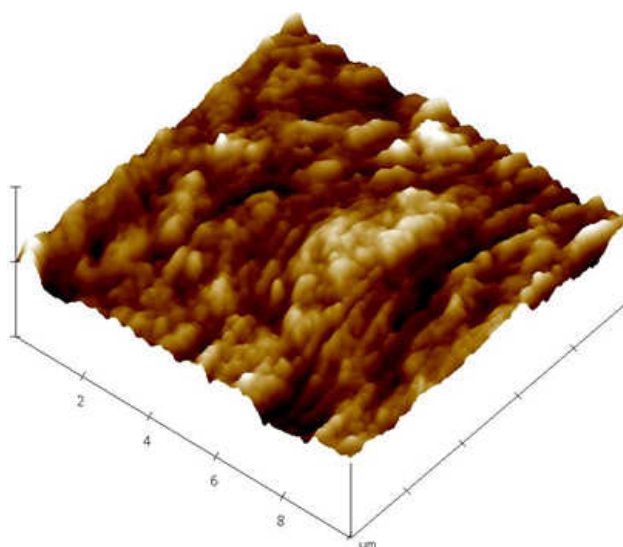


Figura 57- Microscopia de força atômica mostrando a topografia do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.

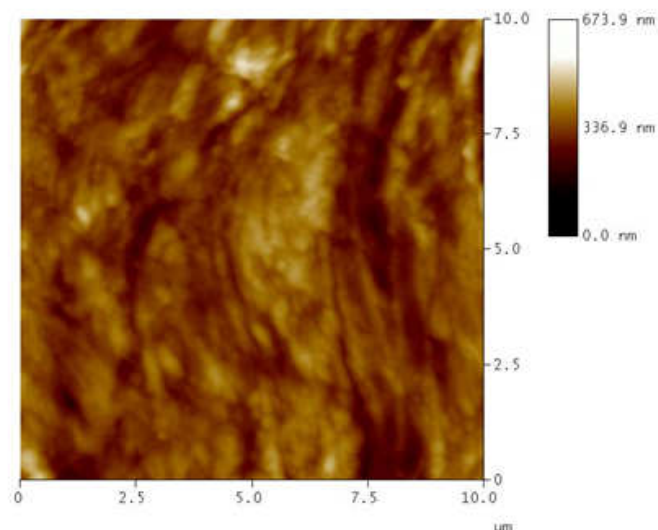


Figura 58 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20 μ m x 20 μ m de área.

A rugosidade encontrada ($R_a = 63,385$ nm) também é maior tornando o filme mais irregular. Este resultado, ao menos em teoria não era esperado considerando principalmente a possibilidade de uma maior interação entre as fases si comparado com as blendas de PEO e os copolímeros PE-b-x%PEO.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.

Tabela 1- Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.

Filme	R_a (nm)	R_q (nm)	z (nm)
Q	1,323	1,762	27,057
Q/PEO	59,438	77,995	792,17
Q/PE-b-80%PEO	53,340	67,265	569,06
Q/PE-b-50%PEO	93,409	137,98	1,226
Q/PE-b-PEOCOOH	63,385	87,543	1,028

4.2.2 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA CRISTALINIDADE.

A Figura 59 mostra os difratogramas de difração de raios X para os filmes de quitosana e o as blendas preparadas com o PEO os copolímeros PE-b-x%PEO.

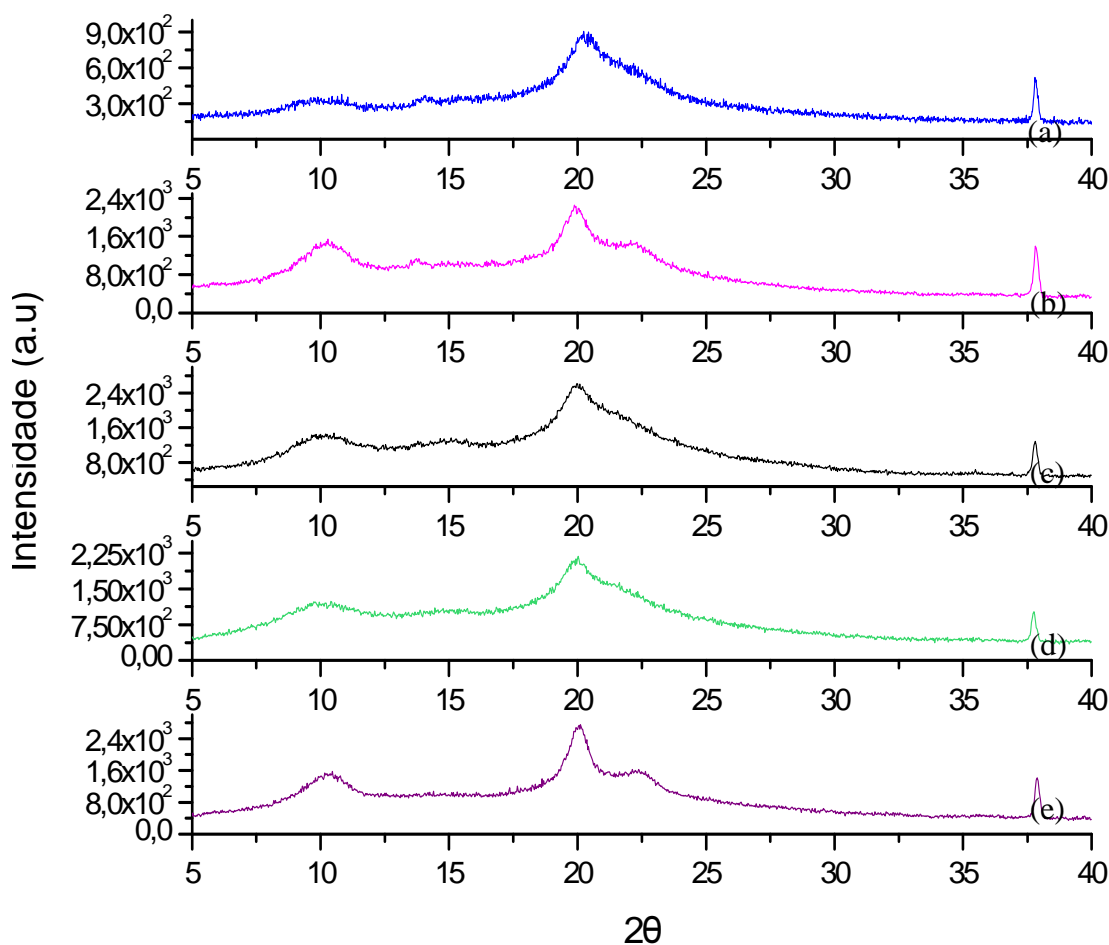


Figura 59 - Difratograma dos filmes de quitosana pura (a), Q/PE-B-50%-PEO (b), Q/PE-B-80%-PEO (c), Q/PE-B-PEO-COOH (d) e Q/PEO (e)

Os picos cristalinos da quitosana a $8,3^\circ$, $19,9^\circ$, $22,2^\circ$ e $28,0^\circ$, tem sua intensidade modificada nas misturas com o PEO e os copolímeros.

Os valores da percentagem de cristalinidade calculados (Tabela 2) indicam que a adição do copolímero com maior contribuição de PEO e do PEO se observa uma diminuição da cristalinidade na blenda mais acentuada quando maior foi a

presença do PEO em relação a quitosana não modificada e ainda maior para o copolímero PE-b-80%PEOCOOH.

Tabela 2 - Cristalinidade das blendas de quitosana.

Polímero	Cristalinidade (%)
Q	56,83
Q/PE-b-50%-PEO	57,69
Q/PE-b-80%-PEO	47,32
Q/PEO	40,47
Q/PE-b-%80PEOCOOH	29,08

Considerando a estrutura do PEO e do copolímero modificado Q/PE-b-%PEO-COOH, parece ser consequência de uma maior interação entre as fases o que pode vir a dificultar o processo de cristalização da quitosana.

4.2.3 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: INTERAÇÕES ENTRE AS FASES POLIMÉRICAS.

A análise das interações entre a quitosana e o polióxido de etileno e seus copolímeros nas blendas formuladas foi realizado com auxílio da espectroscopia infravermelha (Figura 60).

As absorções dos agrupamentos existentes nas estruturas do PEO e os copolímeros basicamente são mascaradas pelas absorções da fase em maior proporção (80%) a quitosana, apenas destaca-se a contribuição dos estiramentos C-H a 2900 cm^{-1} que faz modificar a relação de intensidade entre as sinais na região de 3400 cm^{-1} devida aos estiramentos OH.

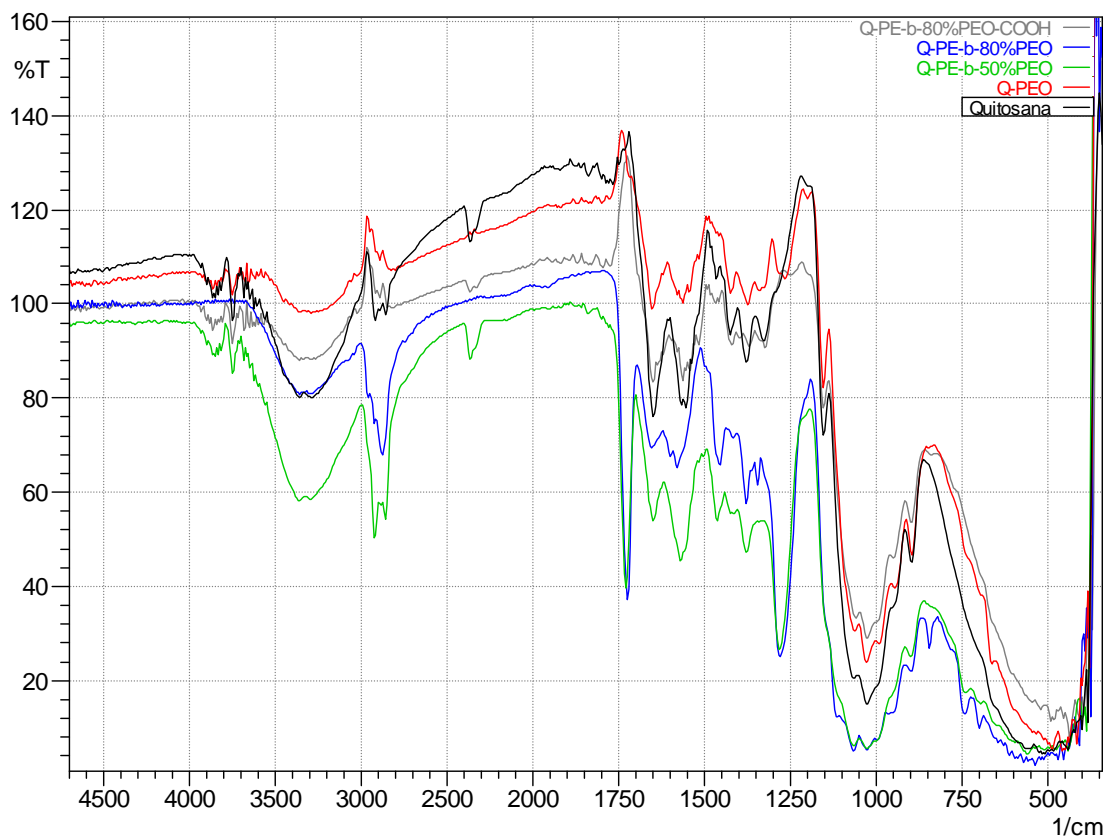


Figura 60- Espectros de infravermelho (ATR) da quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros PE-PEO.

Os espectros das blendas não acrescentam informação em relação as possíveis interações existentes entre as fases, responsáveis pela homogeneidade observada na microscopia eletrônica de força atômica.

4.2.4 – TRANSPORTE DE MASSA: PERMEABILIDADE

As medidas de coeficiente de permeabilidade para a quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros foram obtidas utilizando como permeante vapores de água em diferentes temperaturas (50°C, 55°C e 60°C) com o propósito de determinar as energias de ativação associadas ao processo de permeação destes vapores nos filmes densos.

As Figuras 61 - 63 apresentam as curvas de tempo de retardo (*time lag*) em função do tempo para as diferentes temperaturas para as blendas preparadas com o

PEO os copolímeros PE-b-x%PEO. As maiores diferenças observadas nestas curvas aparecem para a temperatura de 50 °C para as blendas de Q/PEO e Q/ PE-b-80%PEO.

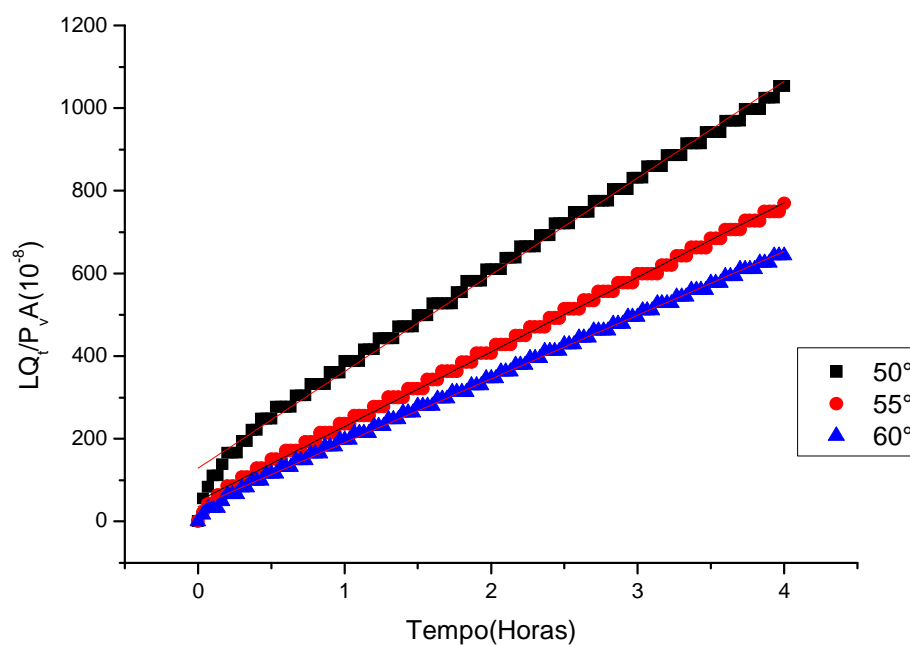


Figura 61- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C

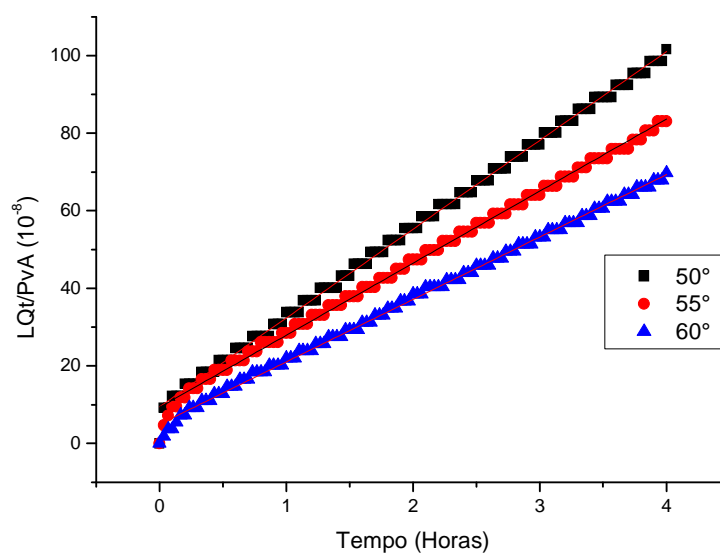


Figura 62- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PE-b-80%PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°

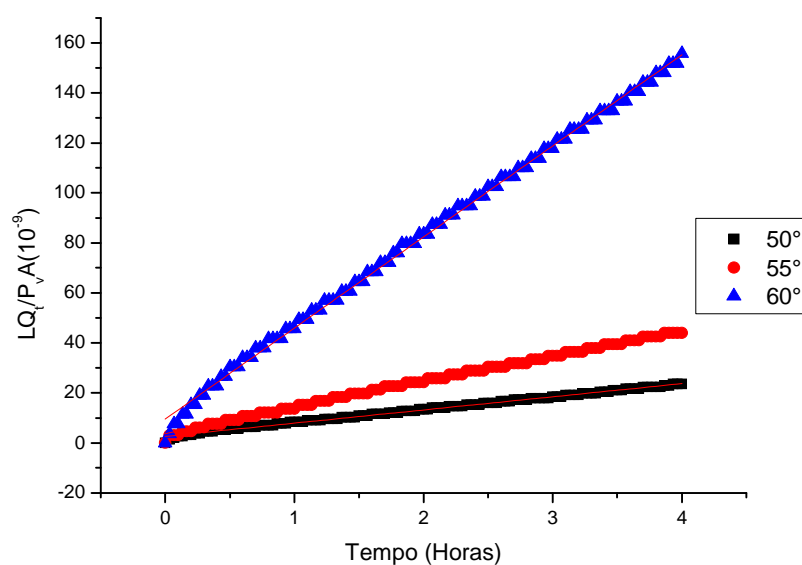


Figura 63- Gráfico LQ_t/P_vA versus tempo para a Q/PE-b-80%PEO-COOH nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C

Os valores de permeabilidade obtidos a partir do estudo do tempo de retardo (Tabela 3) a diferentes temperaturas apresentaram mudanças pequenas na inclinação das curvas (Figuras 21-23) para cada uma das blendas estudadas, diferentemente do observado para a quitosana. Este comportamento no caso das blendas indica uma fraca dependência com a temperatura na faixa de 50-60°C

Tabela 3 - Tabela de coeficientes de permeabilidade das blendas (inéditos não disponíveis na literatura).

<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Polímero</i>	<i>Coefficientes de permeabilidade (Barrer)</i>
50	Q	$6,44 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$2,34 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$2,29 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$5,27 \times 10^{-7}$
55	Q	$4,89 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$1,80 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$1,86 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$4,60 \times 10^{-7}$
60	Q	$3,32 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$1,54 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$1,61 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$3,64 \times 10^{-7}$

As diferenças nos valores de permeabilidade observados para a quitosana não podem ser explicados a partir da porcentagem de cristalinidade dos filmes de quitosana em relação a as blendas estudadas já que o efeito barreira da fase cristalina originaria uma diminuição do coeficiente de difusão e assim originar uma diminuição da permeabilidade ($P=DH$).

Uma explicação destes resultados pode estar relacionada com as interações específicas tipo ponte de hidrogênio que podem ter lugar entre o vapor da água e os grupos polares da quitosana o qual deve favorecer a permeação através do filme.

Em misturas poliméricas a permeabilidade é dependente da interação entre as fases. Assim nas blendas com o PEO e o copolímero PE-b-80%PEO a interação com as moléculas da água decresce e podem vir ser menores que as forças coesivas existente entre as moléculas da água ou que favoreceria a formação de “clusters”, diminuindo a permeabilidade deste filmes.

Na blenda da Q com Q/PE-b-80%PEO-COOH os valores de permeabilidade são maiores que nas outras blendas a consequência de sua menor cristalinidade e por tanto uma maior permeabilidade que a encontrada para a blenda Q/PEO e Q/PE-b-80%PEO.

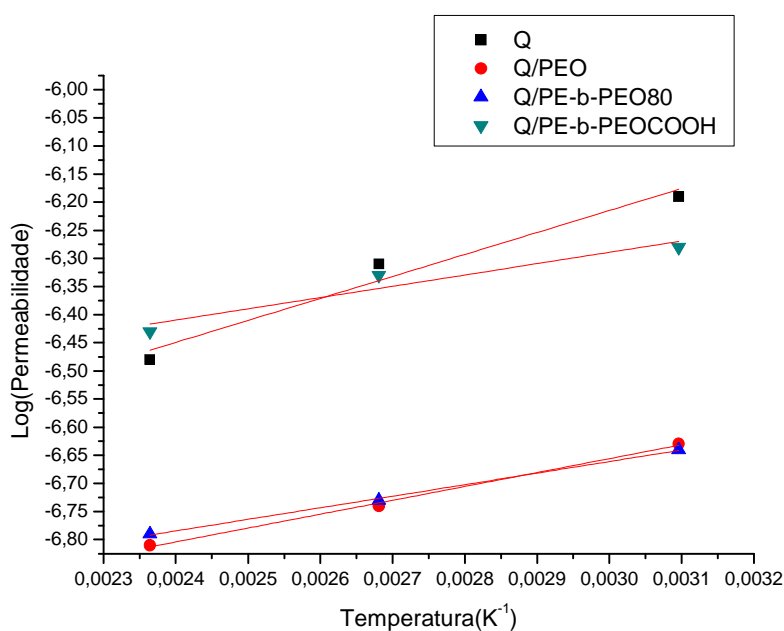


Figura 64- Coeficiente de permeabilidade em escala logarítmica versus o inverso da temperatura

As variações da permeabilidade para a quitosana e suas blendas a diferentes temperaturas (Figura 64) estão influenciadas principalmente pelo coeficiente de solubilidade (H) do diferentes filmes e no caso das blendas adicionalmente existe o efeito do PEO e os copolímeros nas propriedades da fase amorfa.

As energias de ativação associadas ao processo de permeação mostradas na Tabela 4 apontam diferenças entre a quitosana e as blendas que estão relacionadas com a maior mobilidade da fase amorfa nas blendas em relação a quitosana ou que favorecera a difusão das moléculas de permeante (água).

Tabela 4 Energias de ativação da permeação a água para as blendas de quitosana

<i>Blenda</i>	<i>Energia de ativação (KJ/mol)</i>
Quitosana	390,8
Q/PEO	246,9
Q/PE-b-80%PEO	205,5
Q/PE-b-80%PEOCOOH	200,7

Estes resultados reforçam a interpretação dada anteriormente. No processo de permeabilidade ($P = DH$) o coeficiente de solubilidade (H) da quitosana é que determina as diferenças encontradas em relação a suas blendas.

4.2.5 – DIFUSIVIDADE TÉRMICA

Foram realizadas medidas de difusividade térmica para caracterizar o comportamento térmico das blendas de quitosana (Figuras 65-67).

A Figura 65 apresenta a amplitude do sinal em função da frequência modulada para a blenda de Q/PEO, pode ser observado que para modulações de frequência de 10 Hz a escala de amplitude do sinal tem valor de $f^{0,062}$, este valor sugere que a blenda tem baixa flexão termo elástica. Na Figura 65 são apresentados os dados experimentais e o ajuste aos dados pela expressão teórica. O valor da difusividade térmica obtida a partir do ajuste dos dados foi $3,86 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$. Para a blenda de Q/PE-b-80%PEO apresentada na Figura 66, verifica-se que a amplitude do sinal diminui bruscamente para $f^{2,1}$ e nesta faixa a característica termo elástica é predominante e o valor da difusividade térmica tem um aumento significativo cerca de 55%, $5,99 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ do valor referente à blenda de Q/PEO.

A blenda de Q/PE-b-80%PEO-COOH mostrada na Figura 67, exibe um comportamento diferenciado, o valor de difusividade térmica é muito elevado $16 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, o ajuste dos dados experimentais é feito de forma a aproximar os dados do modelo teórico e neste caso a dispersão é muito alta, o que pode ser associado à interação do grupo carboxila deste copolímero modificado.

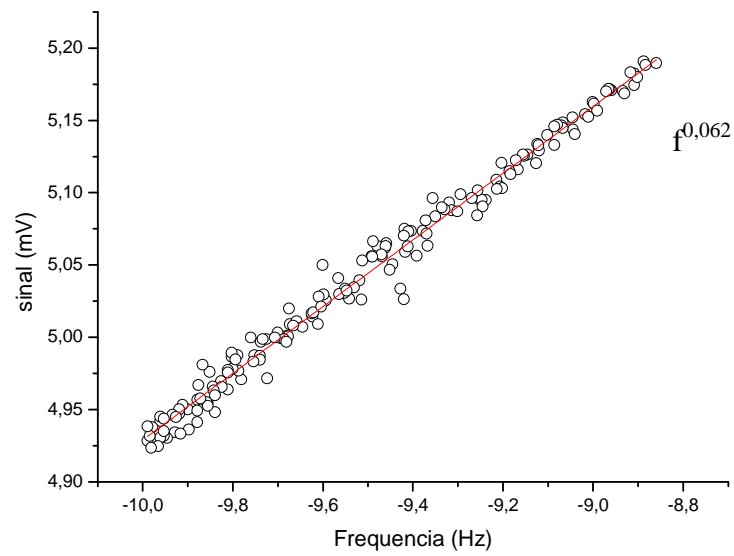


Figura 65- Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PEO.

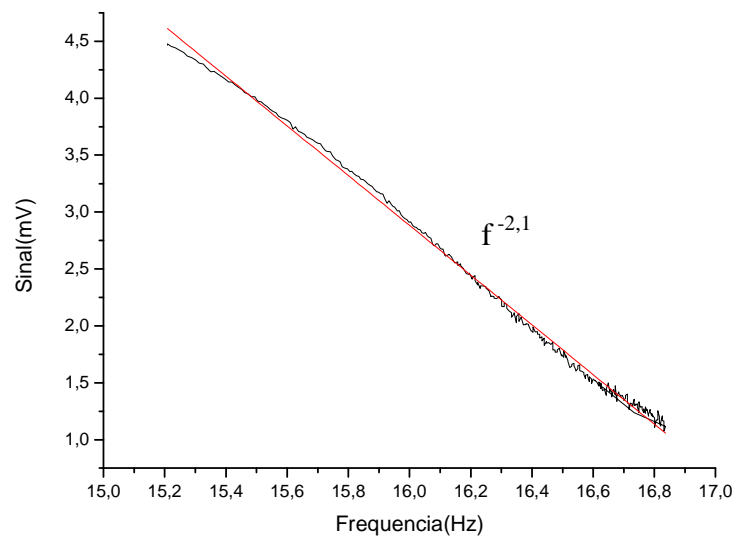


Figura 66 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO.

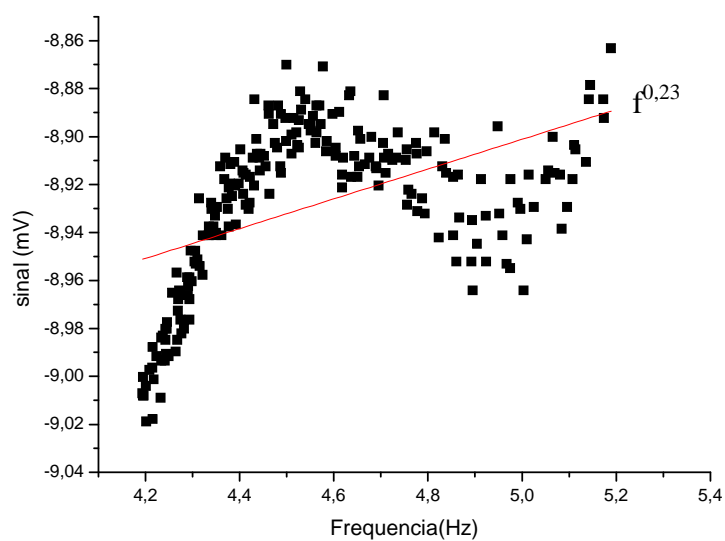


Figura 67 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO-COOH.

4.1.7 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TÉRMICA

Na Figura 68, apresenta-se a evolução temporal da temperatura para as blendas. Essa evolução permite obter a capacidade térmica específica, a curva superior representa o aumento de temperatura da amostra quando exposta à iluminação. A curva inferior representa a interrupção da chegada da luz à amostra após a temperatura da mesma atingir o patamar de saturação. A Tabela 5 resume os valores encontrados para a capacidade térmica específica após os ajustes experimentais.

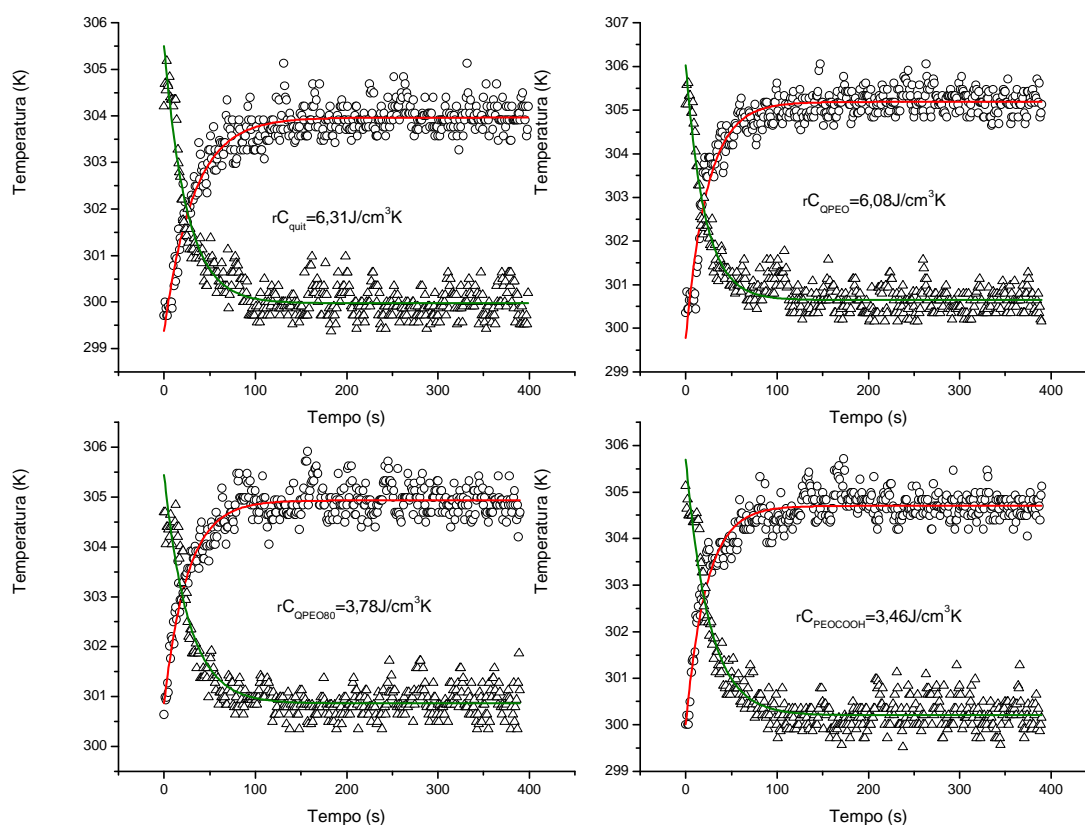


Figura 68- Evolução da temperatura com o tempo para as blendas

Tabela 5 - Propriedades térmicas das blendas obtidas através das propriedades fototérmicas

<i>Amostra</i>	<i>Capacidade térmica específica (J/cm³K)</i>	<i>Difusividade térmica (cm²/s)</i>	<i>Espessura do filme (μm)</i>
Quitosana	6,31	-	-
Q/PEO	6,08	$3,86 \times 10^{-4}$	56
Q/PE-b-PEO80%	3,78	$5,99 \times 10^{-4}$	87
Q/PE-b-PEO-COOH	3,46	16×10^{-4}	85

Nota-se que nos copolímeros ocorre uma queda no valor da capacidade térmica específica. Sendo a capacidade térmica específica a quantidade de energia

necessária para elevar em 1°C a massa do polímero ou a blenda é esperada esta diminuição uma vez que a energia de ativação para as blendas diminui em função da quantidade PEO nas blendas.

4.2.7 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO E MECÂNICO DA QUITOSANA E SUAS BLENDA.

As curvas calorimétricas diferenciais (DSC) da quitosana e as blendas com PEO os copolímero PE-b-%80 PEO e PE-b-80%PEO-COOH não apresentam um comportamento térmico marcadamente diferente.

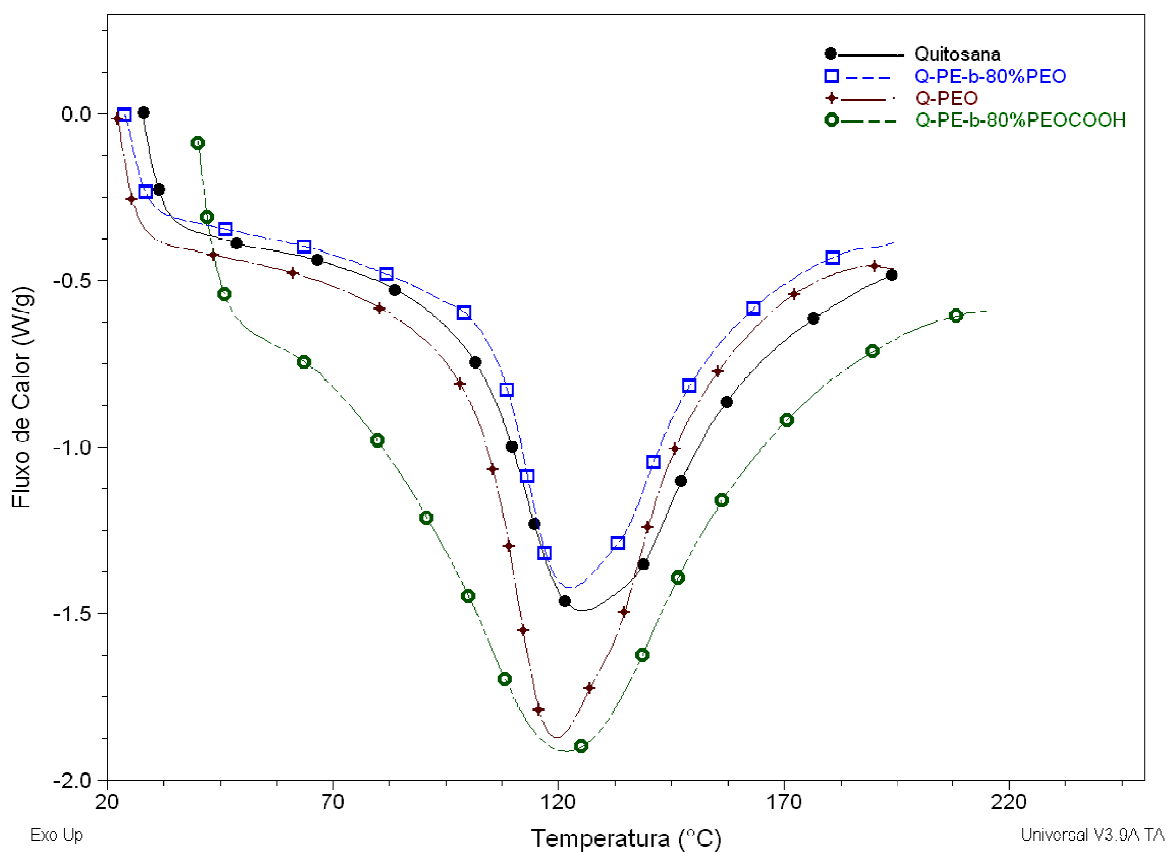


Figura 69 - Curvas de DSC para os filmes de quitosana e sua blendas

As temperaturas de fusão (Tabela 6) diminuem levemente na mistura com o PEO os copolímeros.

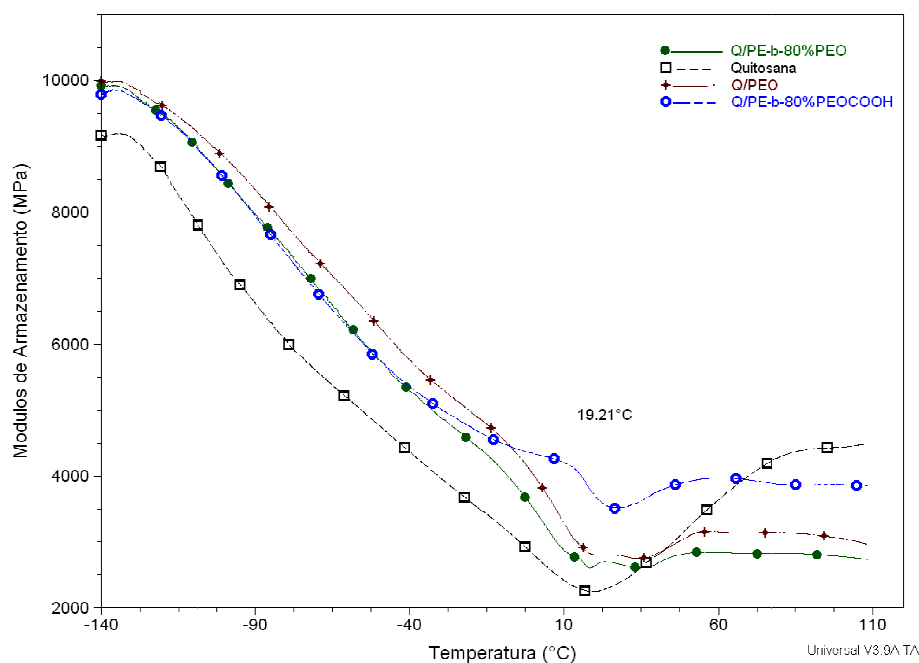
Tabela 6 - Temperaturas de fusão da quitosana e suas blendas

Polímero/Blenda	$T_m/^\circ\text{C}$
Q	125,5
Q-PEO	119,6
Q-PE-b-80%PEO	122,5
Q-PE-b-80%PEO COOH	121,8

A diminuição da T_m acompanha principalmente ao conteúdo de PEO na mistura.

O comportamento dinâmico mecânico (DMA) (Figuras 70-72) dos filmes em estudo apresentam módulos com valores próximos. Sua principal diferença está no fenômeno de cristalização que se observa a partir de temperaturas próximas a 20 $^\circ\text{C}$.

Nas blendas a cristalização e o impacto da cristalização é mais discreto, e como constatado nas análises por difração de raios x, acontece em menor extensão, apresentando módulos acima de 20 $^\circ\text{C}$ menores que o da quitosana.

**Figura 70-** Módulo de armazenamento (E') para a quitosana e blendas

O comportamento observado nos módulos de perda (Figura 71) permite identificar a maior heterogeneidade das fases nas misturas.

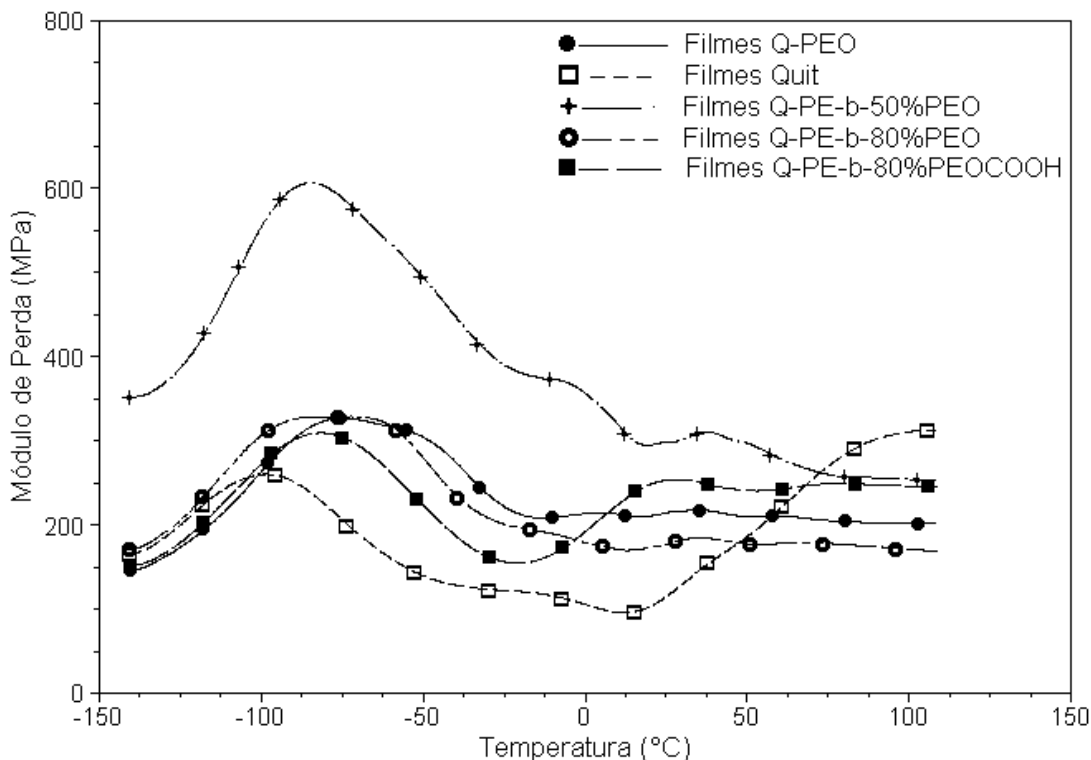


Figura 71- Módulo de perda para quitosana e blendas.

Em geral os filmes formulados com a quitosana modificada são mais rígidos que o de quitosana em temperaturas relativamente baixas (inferior a 10 °C). Entretanto em geral como pode ser constatado na Figura 71 a temperaturas acima de 20 °C os filmes das blendas com exceção da blend a com PE-b-50%PEO, parecem apresentar uma menor tendência a cristalizar (o módulo E' não aumenta) que o filme de quitosana.

Os registros da curva $Tg \delta$ (Figura 72) mostram uma relaxação β nas blendas e quitosana associada aos grupos (-CH₂OH) presentes na quitosana (Chao, 2004). As temperatura mais altas encontradas para estas transições nas blendas em relação a quitosana denota a existência de interação entre as fases, próprio de uma mistura ou blenda miscível.

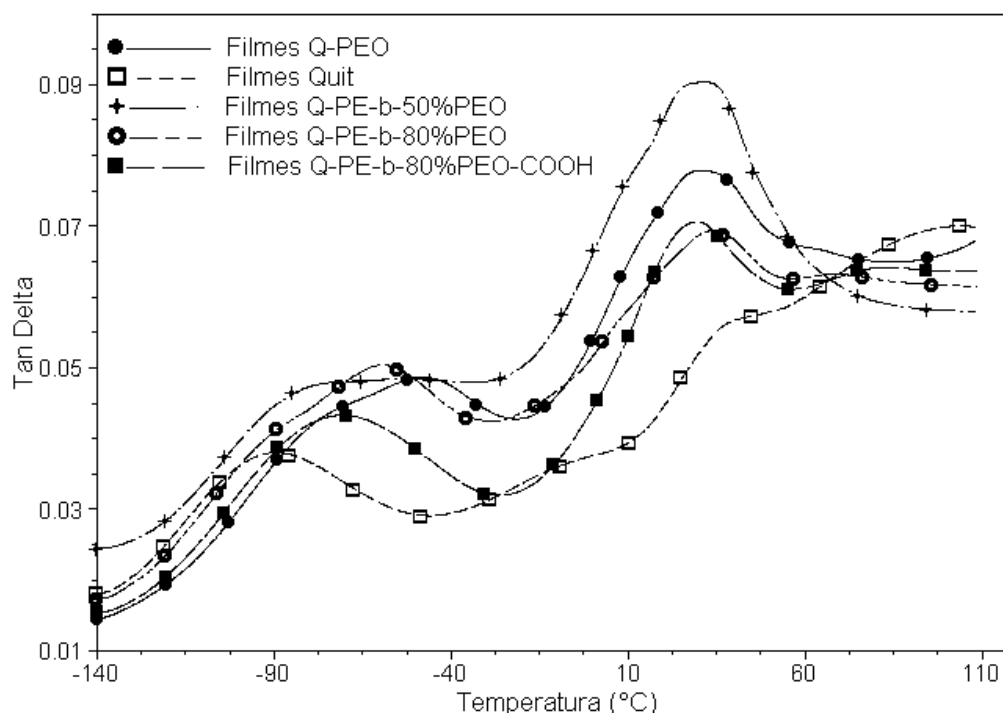


Figura 72-Tangente de delta para quitosana e blendas

Outra diferença é a existência de sinais mais largas nas blendas em relação a quitosana indicativo da maior heterogeneidade dos domínios nas blendas.

O estudo da modificação da quitosana utilizando o PEO e os copolímeros PE-b-PEO permitiram caracterizar estes sistemas como miscíveis, entretanto não mostram diferenças significativas entre estas blendas e a quitosana em relação a suas propriedades de transporte, morfológicas e mecânicas.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS MAGNETICAS A PARTIR DA QUITOSANA OBTIDAS POR *SPRAY DRYING*.

As blendas formuladas e caracterizadas forma utilizadas na formulação das microcápsulas contendo núcleos magnéticos considerando as diferenças encontradas principalmente na cristalinidade dos materiais e o possível impacto das diferenças que introduzem o PEO e os copolímeros no balanço hidrofóbico/hidrofílico da blenda em relação a quitosana.

As microcápsulas produzidas utilizando a técnica de *spray drying* foram preparadas a partir da quitosana e suas blendas com PEO, PE-b-80%PEO, PE-b-80%PEO-COOH nas proporções (80/20)m/m.

As microcápsulas de magnetita (Fe_3O_4) utilizadas foram obtidas utilizando o método da coprecipitação (Yang *et. al.*, 2008). As microcápsulas de magnetita foram sintetizadas a partir de reações de soluções aquosas de 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 hidróxido de amônio em reator.

A obtenção das microcápsulas de quitosana e quitosana modificada foram feitas segundo os parâmetros apresentados na Tabela 7, ressaltando que foi utilizados dois agentes reticulantes para a quitosana, o PEO e seus copolímeros e o TPF. O objetivo foi estabelecer a influência e a contribuição de cada um na modificação das propriedades da quitosana.

Tabela 7 - Parâmetros utilizados na obtenção de microcápsulas de quitosana

Amostras	T_i(°C)	T_s(°C)	Φ(NL/h)	Aspirador(%)	Bomba (mL/min)
Q/ Fe_3O_4	135	90	600	90	15
Q/TPF/ Fe_3O_4	135	87	700	99	15
Q/PEO/ Fe_3O_4	135	88	700	99	13
Q/ PE-b-PEO80/ Fe_3O_4	135	93-95	700	99	11
Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	135	93	700	99	8

4.3.1 – ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.

A Figura 73 mostra as curvas de variação de massa em função da temperatura obtidas através da análise termogravimétrica para as microcápsulas magnéticas (Tabela 8).

Observa-se que a degradação da matriz polimérica ocorre, no mínimo, em dois estágios. O primeiro referente à perda de água retida na matriz, e o segundo, referente à degradação da fase polimérica.

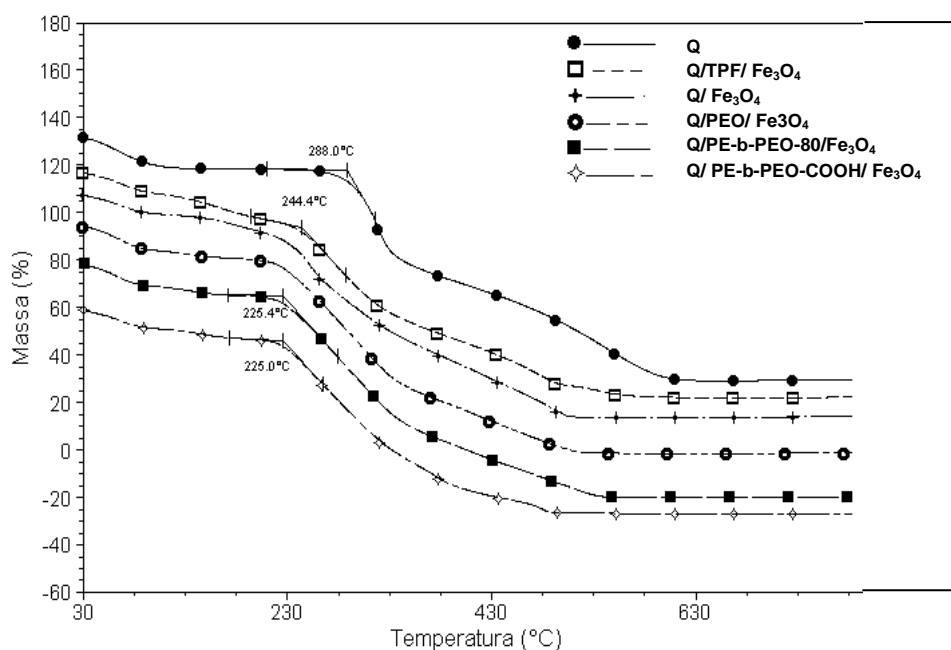


Figura 73- Análises termogravimétricas para as microcápsulas com núcleo de Fe_3O_4 .

O primeiro estágio, esta associado com a perda da água na matriz polimérica, e permite calcular as porcentagens de água retida pela microcápsula (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagem de magnetita e água nas microcápsulas

<i>Microcápsulas</i>	% H_2O	% Nano-Magnetita
Q/TPF/ Fe_3O_4	9,2	7
Q/ Fe_3O_4	8,5	8,2
Q/PEO/ Fe_3O_4	10,2	6,6
Q/PE-b-PEO-80/ Fe_3O_4	9,7	4,2
Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	8,1	16,5

Os valores indicam a existência de uma relação entre o porcentagem de água retida e o conteúdo de PEO e ainda mostra o impacto da modificação do copolímero PE-b-80%PEO-COOH sobre a água retida na matriz. Este resultado esta de acordo com a interpretação dada aos resultados do módulo de perda, DMA, (Figura 74) no que se associa o deslocamento da transição β a interações entre as fases com participação dos grupos hidroxilas.

Em temperaturas superiores (~ 230 °C), observa-se que as microcápsulas, formuladas com as blends, apresentam uma discreta redução da temperatura “onset” do processo de degradação. Esta diminuição no resulta significativa para o

uso previsto como suporte catalítico de um processo que no se realiza a temperaturas tão altas devido a estabilidade das enzimas imobilizadas.

A derivada da curva de variação de massa (DTG) (Figura 74) permitem apreciar com maior detalhe as diferenças entre as blends e a quitosana.

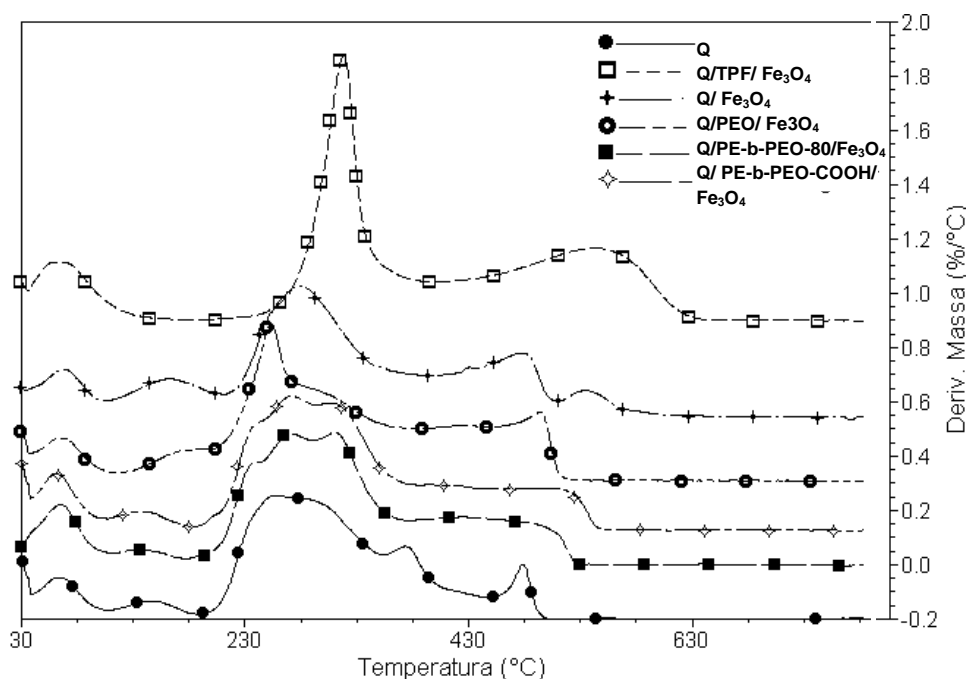


Figura 74 - DTG das microcápsulas de quitosana com núcleo de magnetita.

Em particular destaca-se como a contribuição do PEO modifica o processo de degradação entre 208-400 °C e a presença das terminações carboxílicas na blenda Q-PE-b-80%PEO-COOH.

As cargas das microcápsulas (Tabela 9) determinadas a partir do resíduo registrados nas curvas termogravimétricas (Figura 73) indicam a carga de magnetita que constitui o núcleo das microcápsulas.

Os valores (% carga) encontrados particularmente diferentes nas blends com o copolímero PE-b-80%PEO, esta associado a menor solubilidade desta fase (PE-b-80%PEO) nas soluções preparadas e utilizadas no processo de formulação das microcápsulas pela técnica de *Spray Drying*.

Considerando que este trabalho tem como objetivo obter partículas para utilização como suporte no processo de obtenção de biocombustíveis utilizando reatores assistidos por campo magnético, procura-se comparar as microcápsulas

obtidas pela técnica de *Spray Drying* com as microcápsulas preparadas pela técnica de coagulação que produz partículas maiores com uma provável maior retenção no reator assistido por campo magnético.

4.3.2 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCÁPSULAS PREPARADAS COM A TÉCNICA DE *SPRAY DRYING*.

As microcápsulas de quitosana contendo um núcleo de magnetita apresentam um formato esférico e aspecto superficial enrugado (Figura 75).

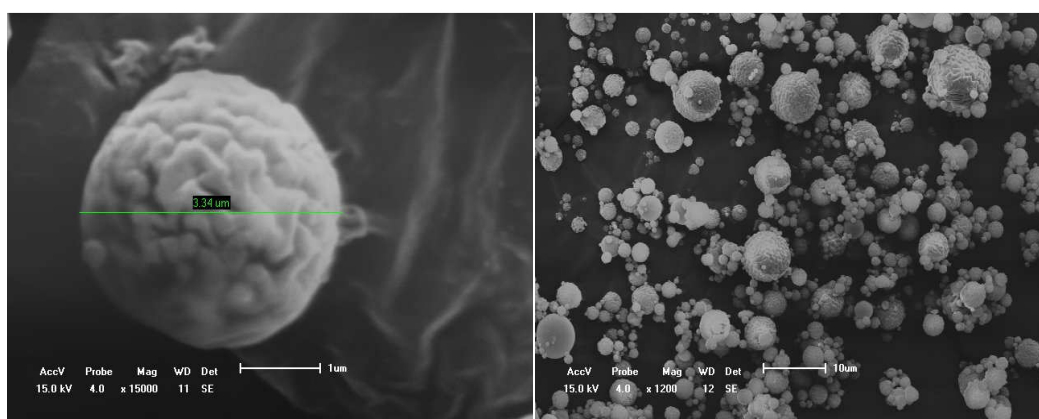


Figura 75 - Micrografia eletrônica de varredura das microcápsulas Q/Fe₃O₄

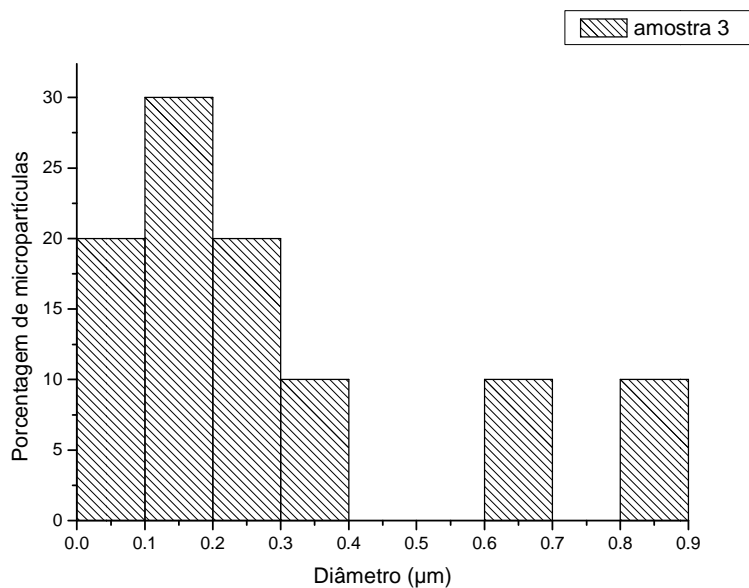


Figura 76 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas – Q/ Fe_3O_4

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 (Figura 76) indica que a maior fração de partículas (29%) das microcápsulas possuem diâmetro médio de 0,15 μm e menos do 20% com diâmetros entre 0,6 - 0,9 μm .

Estas microcápsulas magnéticas são formuladas com o objetivo de imobilizar a enzima covalentemente, entretanto foi avaliada a alternativa de imobilização por encapsulamento e a quitosana foi modificada utilizando trifosfato de sódio, FTP, (Figura 77).

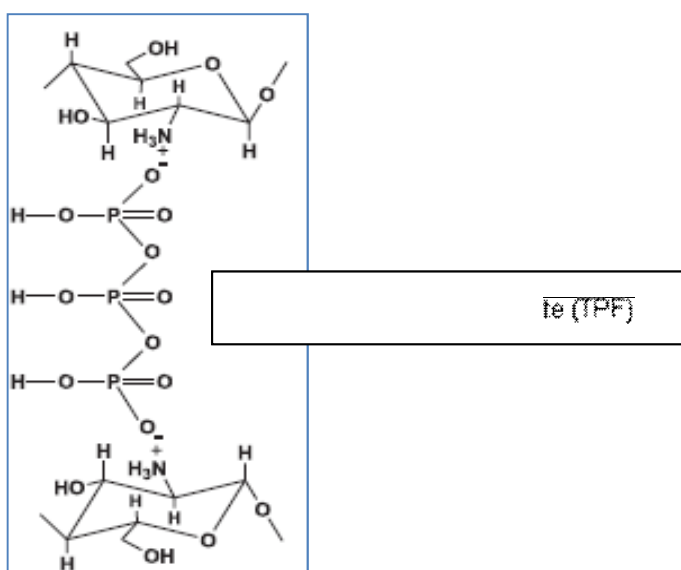


Figura 77 - Modificação da quitosana com trifosfato de sódio (TPF)

As microcápsulas de Q/TPF/ Fe_3O_4 mostrada na Figura 78, apresentaram uma maior rugosidade que as de Q/ Fe_3O_4 e tem formato esférico.

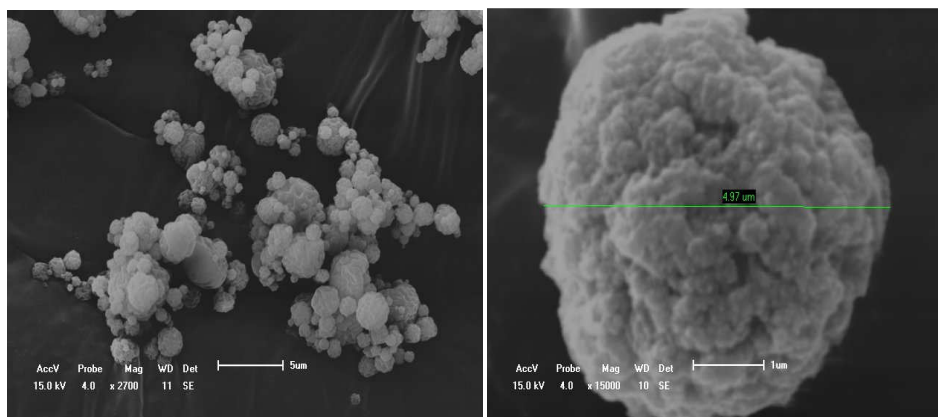


Figura 78- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4 .

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/TPF/ Fe_3O_4 (Figura 79), apresenta-se mais larga que para a Q/ Fe_3O_4 28% das microcápsulas se localizam abaixo de $0,25\mu\text{m}$ e (cerca de 50% em cada faixa) e as restantes entre $0,3$ e $0,55\mu\text{m}$.

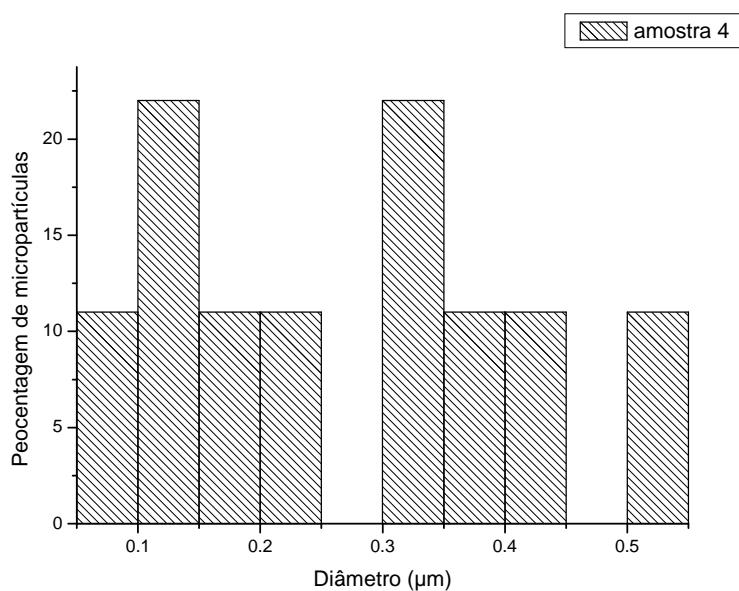


Figura 79 -Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4 .

As microcápsulas formuladas com a blenda Q/PEO (Figura 80) apresentam uma morfologia na que se apreciam ondulações irregulares efeito que pode estar associada com a baixa temperatura de fusão do PEO, inferior a temperatura utilizada no dispersor do *Spray Drier* (135 °C).

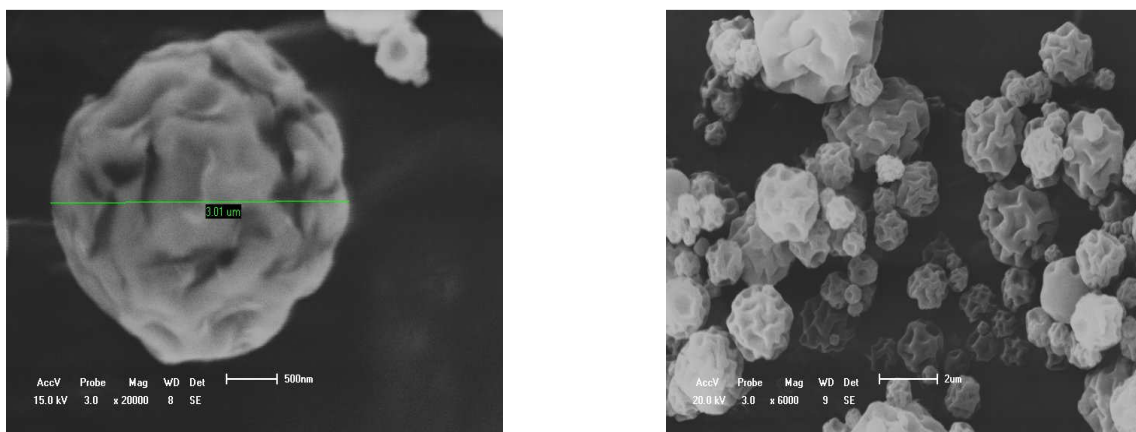


Figura 80 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das micropartículas Q/PEO/Fe₃O₄

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/PEO/ Fe₃O₄ (Figura 81), se caracterizam por uma distribuição diferenciada na que o 60% das microcápsulas se localizam a 0,15, 0,35 e 0,55μm.

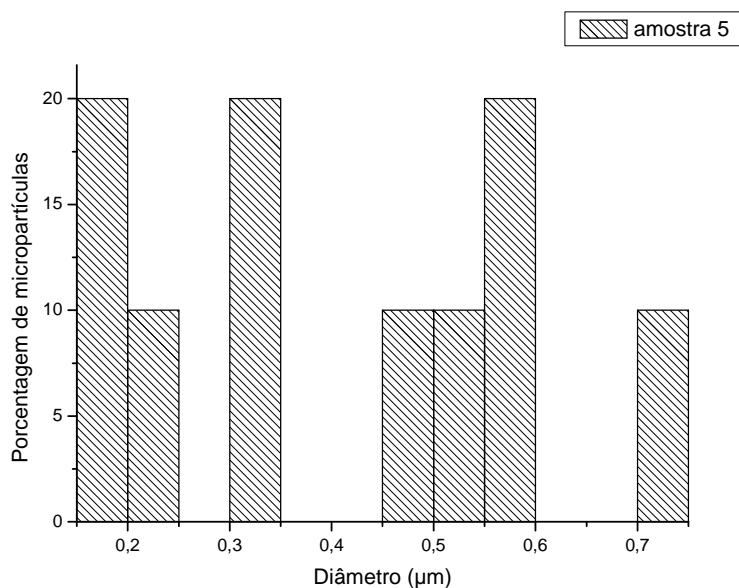


Figura 81-Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/PEO/ Fe₃O₄

As microcápsulas da blenda Q/PE-b-80%PEO (Figura 82) apresentam também uma morfologia na que se apreciam ondulações irregulares o que igualmente associamos a sua baixa temperatura de fusão (54 °C).

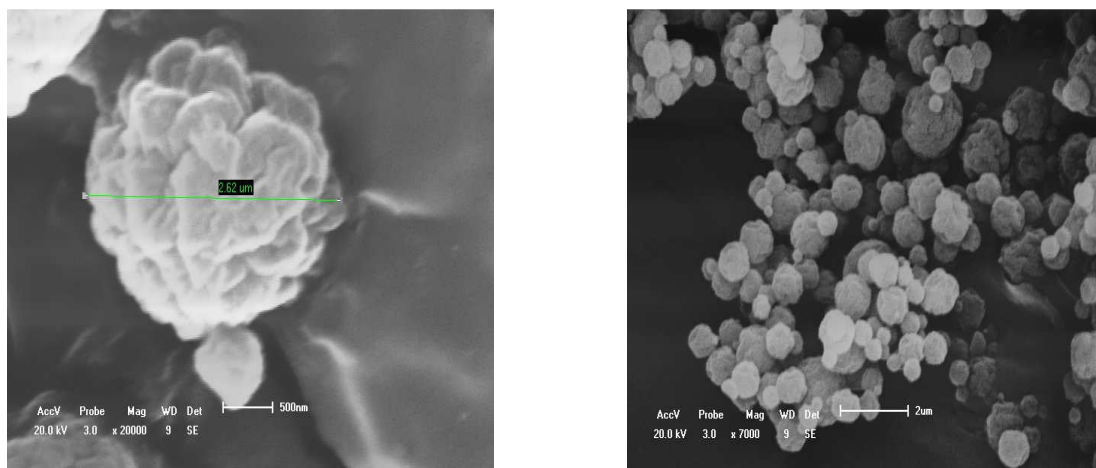


Figura 82- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/Fe₃O₄

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/PE-b-PEO80%/ Fe₃O₄ (Figura 83), apresentam a maior regularidade de tamanho das formulações estudadas, localizando entre 0,1 e 0,4 μm 80% da microcápsulas.

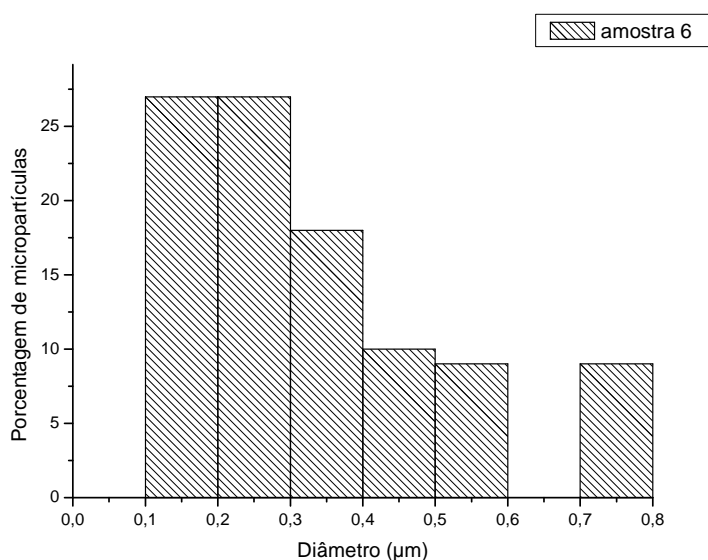


Figura 83 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/Fe₃O₄.

As microcápsulas de Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4 mostrada na Figura 84 apresenta uma rugosidade suave pouco expressiva. Este resultado é coerente com aqueles obtidos com as blendas de Q/ PE-b-PEO-COOH através da microscopia de força atômica, onde a quantidade de PEO adicionada à solução interfere de forma significativa na rugosidade.

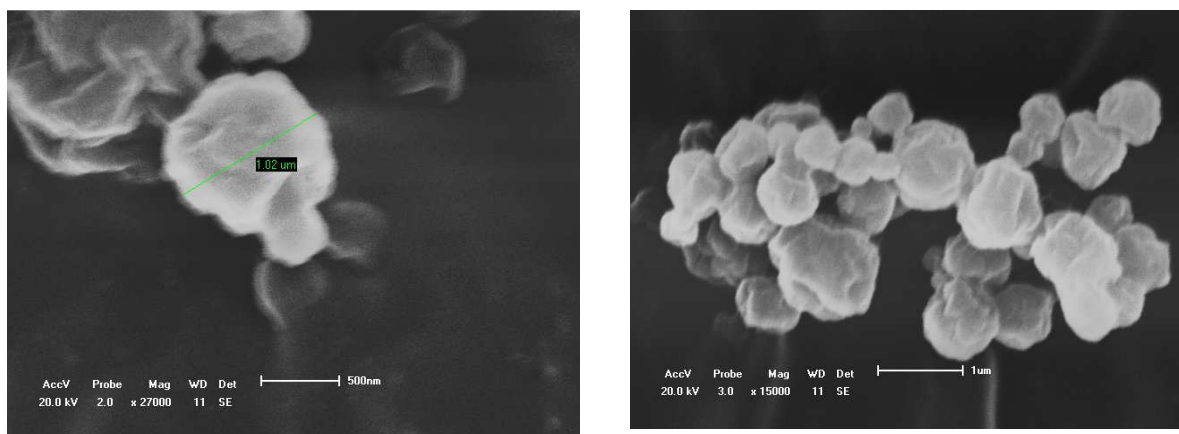


Figura 84 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4

A Figura 85, apresenta o histograma de distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4 , evidenciando que 23% das microcápsulas possuem tamanho de aproximadamente 0,3 μm .

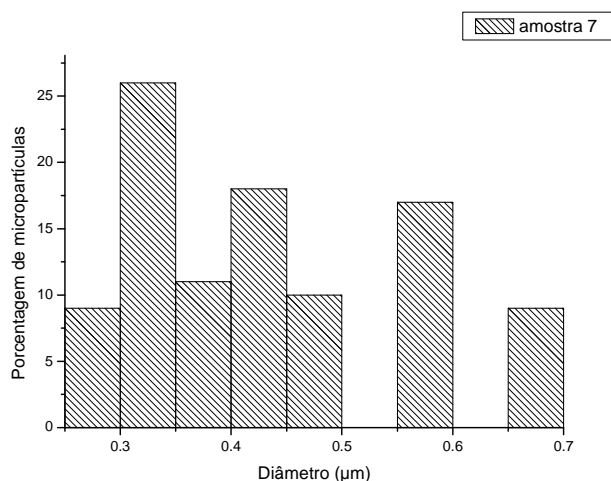


Figura 85 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4

A microcápsulas de Q/TPF/ Fe₃O₄ possuem grande parte da distribuição de tamanho entre 0,3 e 0,55 µm, isto mostra que a adição do TPF como reticulante provocou um aumento na porosidade da quitosana, bem como um possível aumento na área superficial dos poros.

4.3.2 – POROSIDADE

Para a quitosana e suas blendas, a porosidade pode ser influenciada pela rota de preparação e as variáveis dos processos de formulação. Na etapa de preparação, os parâmetros mais importantes foram a concentração da solução de quitosana e a concentração da solução de NaOH (Beppu e Santana, 1999).

Através do método BET para análise de porosidade, foram obtidas as curvas isotermas dos processos de adsorção e dessorção de nitrogênio para as microcápsulas de Q/ Fe₃O₄ os resultados obtidos são apresentados na Figura 86.

Empregando modelos matemáticos associados ao método BET, foram obtidos os dados referentes à isoterma das microcápsulas. Estes dados foram fornecidos pelo software *Quantachrome Corporation* e são relacionados na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados de volume e área superficial para as microcápsulas.

<i>Micropartícula</i>	<i>Área superficial</i>	<i>Volume dos poros</i>	<i>Diâmetro de poro (adsorção)</i>	<i>Diâmetro de poro (dessorção).</i>
Q/ Fe ₃ O ₄	2,3 m ² /g	1,22 x 10 ⁻² cm ³ /g	16,16 Å	18,02 Å
Q-TPF/ Fe ₃ O ₄	3,18 m ² /g	1,65 x 10 ⁻² cm ³ /g	19,49 Å	28,89 Å

Na Figura 86 é apresentado o gráfico com a curva de distribuição de porosidade destas microcápsulas de Q/Fe₃O₄ com propriedades magnéticas. Observa-se que os poros têm sua distribuição em duas regiões distintas, entre 20-50 Å e 50 - 2000 Å.

A partir dos resultados é visto que o tamanho dos poros por adsorção é menor que os poros de dessorção, indicando que o material apresenta rugosidade.

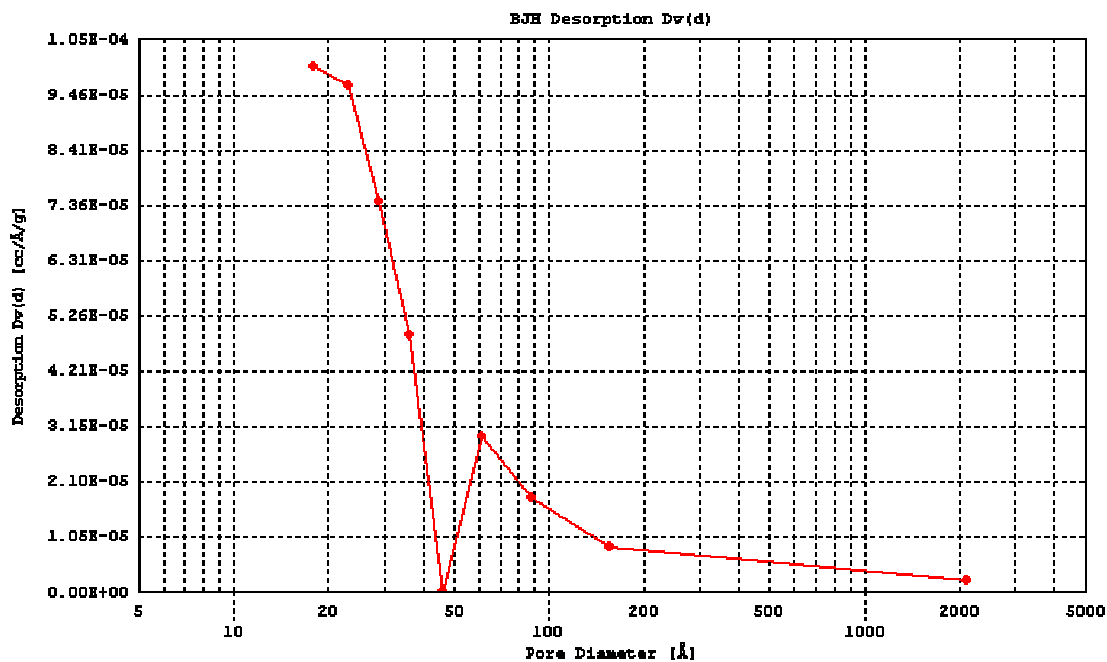


Figura 86 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/Fe₃O₄

Para as microcápsulas de Q/TPF/Fe₃O₄ é possível observar através da Figura 86 uma histerese não significativa entre as curvas de adsorção e dessorção, ou seja, os valores de pressão relativa e volume tiveram pequenas variações, isto acontece com poros pouco arredondados.

A histerese está associada à da morfologia dos poros e a adição de TPF propiciou a mudança na morfologia das microcápsulas tornando a largura da histerese muito próxima de zero.

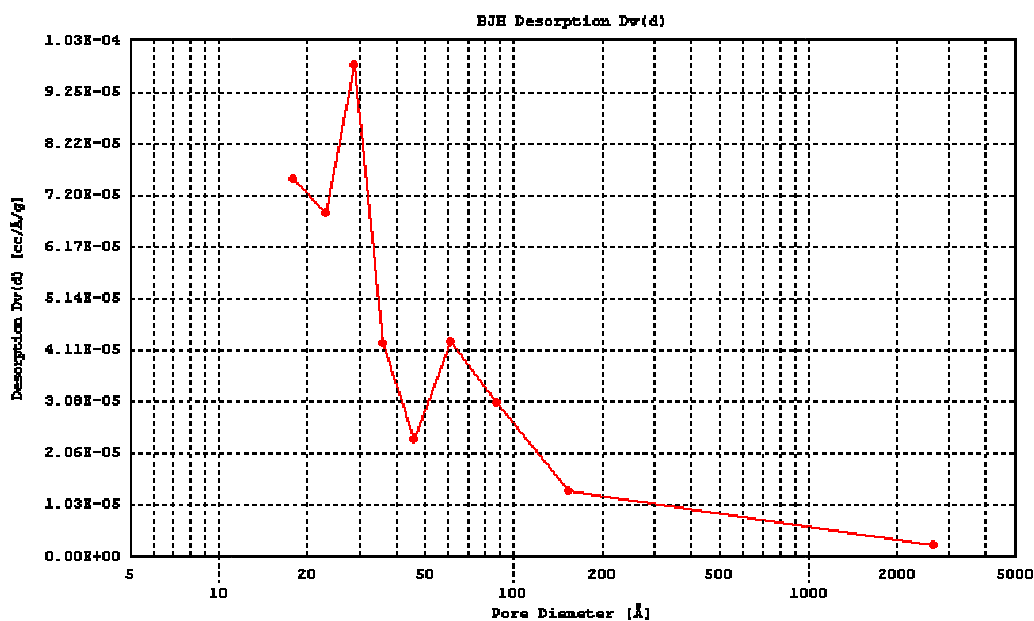


Figura 87 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/TPF/Fe₃O₄

A partir da Tabela 9 pode-se afirmar que para as microcápsulas reticuladas com TPF, houve um aumento significativo no diâmetro dos poros, com destaque para a dessorção indicando que uma quantidade maior de nitrogênio penetrou nas micropátículas, o que significa uma maior rugosidade nas microcápsulas.

A Figura 87 apresenta o gráfico da distribuição de porosidade destas partículas com propriedades magnéticas. Observa-se que os poros tem sua distribuição em duas regiões distintas, entre 18-45 Å e 45 - 2700 Å

Para as microcápsulas de quitosana reticulada com TPF, houve uma mudança na morfologia dos poros, no entanto, houve um aumento na porosidade, uma vez que o volume dos poros por dessorção aumentou consideravelmente em torno de 50% do volume de poros por dessorção para microcápsulas de quitosana pura.

As microcápsulas apresentaram valores elevados de poros de adsorção e dessorção, isto caracteriza o material como rugoso. É importante ressaltar que, dos fatores que podem influenciar na porosidade a modificação química da quitosana com o TPF, foi o fator que modificou a morfologia dos poros.

4.4 – MICROCÁPSULAS MAGNÉTICAS DE QUITOSANA FORMULADAS PELA TÉCNICA DE COAGULAÇÃO

4.4.1 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO.

A quitosana e a blenda de Q/PEO apresentaram maiores diferença em suas propriedades devido isto, estas foram utilizadas para obter as microcápsulas Q/Fe₃O₄ e Q-PEO/Fe₃O₄ (Figura 88) pela técnica de coagulação procurando incorporar uma maior quantidade de magnetita no núcleo das microcápsulas de forma que torne o suporte mais efetivo num processo em reator de campo magnético.

As microcápsulas de quitosana observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 88) apresentaram um formato esférico e uma superfície relativamente lisa quando utilizadas concentrações de quitosana acima de 2% m/m e mais porosa para concentrações de 2%.

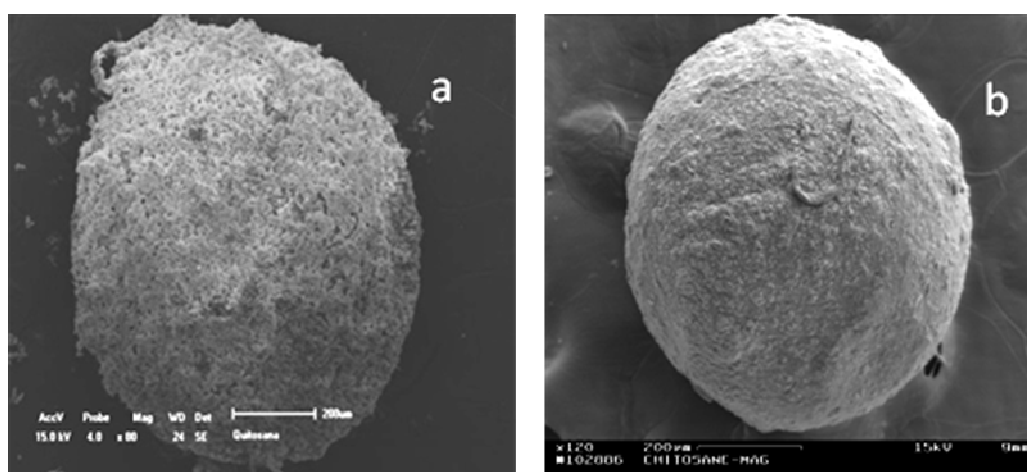


Figura 88 - Microcápsulas de Q/Fe₃O₄ (a) concentração 2% e (b) concentração 3%

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 .

As microcápsulas de Q-PEO/ Fe_3O_4 observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 89) apresentaram um formato mais achatado e uma superfície rugosa quando utilizadas concentrações de quitosana iguais ou superiores a 2% m/m.

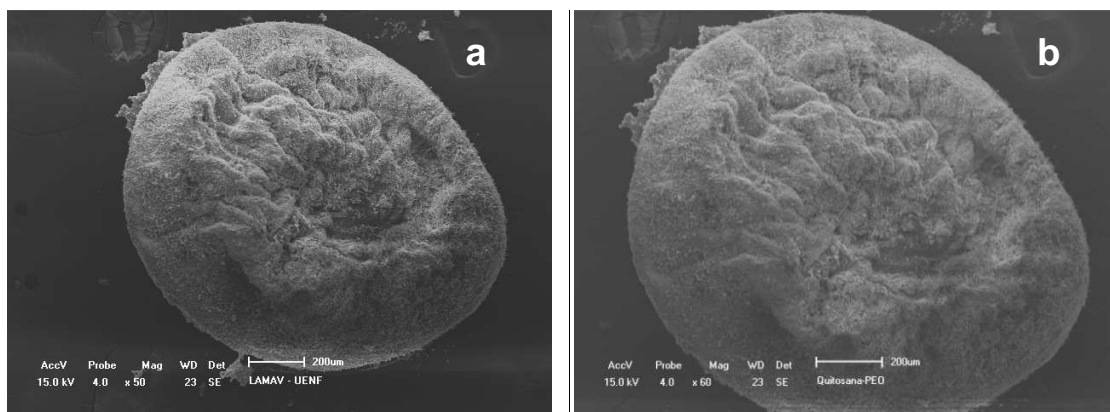


Figura 89 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 /PEO (a) concentração 2% e (b) concentração 3%

4.4.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA E CARGA DE Fe_3O_4 NAS MICROCÁPSULAS.

Com o auxílio da termogravimetria (TGA/DTG) foi analisado o efeito da carga de magnetita na estabilidade da matriz e foi determinada a carga magnética, informação necessária para o análise do comportamento magnético do suporte.

A curvas de TGA/DTG (Figura 90) não indicam mudanças significativas na estabilidade da quitosana.

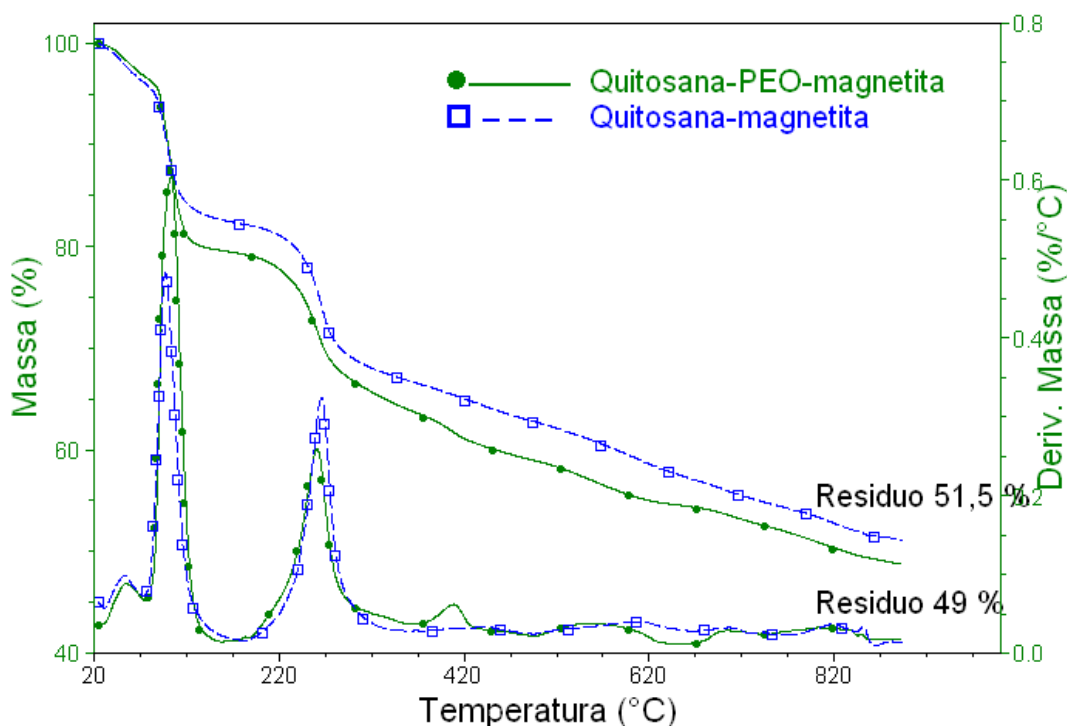


Figura 90 - Curvas termogravimétricas das microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada com PEO.

O comportamento térmico observado para a quitosana se caracteriza basicamente pela presença de um pico a 54°C (5%) e a 96°C (15%) associados a perda da água. A segunda principal perda com taxa máxima a 267°C deve-se a decomposição (térmica e oxidativa), vaporização e eliminação de voláteis da quitosana.

De acordo com a literatura este processo de pirólise dos polissacarídeos se inicia com um processo de quebra randômica das ligações glicosídicas seguida da posterior decomposição com formação de ácido acético e ácidos graxos de baixa massa molar (C2, C3 e C6 principalmente).

As cargas de Fe_3O_4 de 51% e 49% para a quitosana e a blenda com PEO são comparáveis considerando o possível impacto nas propriedades magnéticas destes suportes.

As variações da massa a 54°C são atribuídas à perda de água em decorrência das ligações fracas existentes entre os grupos hidroxilas da água e os grupos amina da quitosana.

Rueda et al, (1999) constataram que a interação da água com os grupos hidroxila são mais fortes do que com os grupos amina e que a perda de água a 94°C esta associada a interação da água com os grupos hidroxilas.

As microcápsulas magnéticas de quitosana modificada com PEO apresentaram picos mais intensos (perdas maiores) na curva de DTG a 94°C o que é de esperar dado que existe uma maior contribuição de grupos hidroxilas na blenda devido a presença da fase PEO, responsáveis pela interação com a água.

4.4.3 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS MICROCAPSULAS DE QUITOSANA E A BLENDAS COM PEO CONTENDO NÚCLEOS DE Fe_3O_4

O estudo da magnetização das microcápsulas (secas) foram realizados por magnetometria

As Figuras 91 e 92 mostram que as amostras apresentaram histerese negligível (próximo de campo zero), indicando um comportamento super paramagnético, e boa magnetização de saturação.

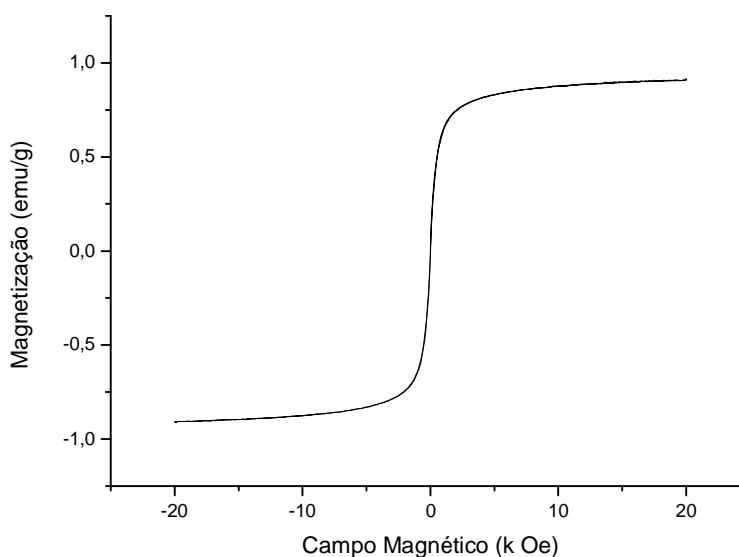


Figura 91 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/ Fe_3O_4

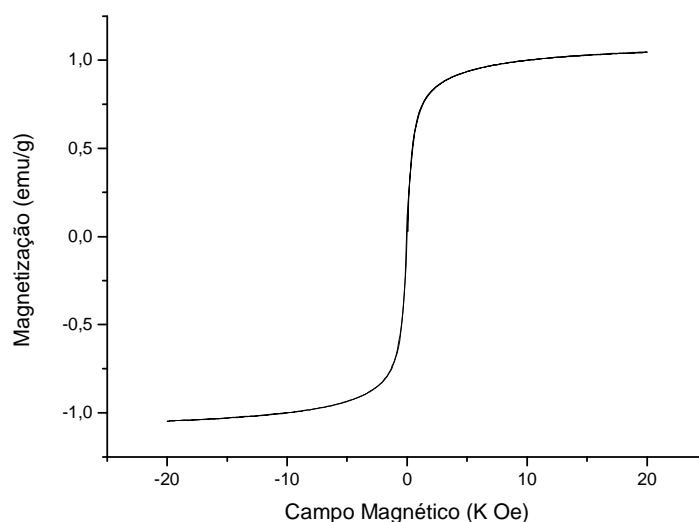


Figura 92 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/PEO/ Fe_3O_4 .

A ausência de histerese evidencia uma baixa coercividade caracterizando 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 ou indução residual. Em outras palavras, o material que foi influenciado pelo campo magnético não permaneceu magnetizado após a retirada do campo magnético.

Outro fato evidenciado pelas medidas magnéticas é que as interações entre as partículas foram pequenas, ou seja, uma partícula não interfere no comportamento magnético da outra.

As microcápsulas de quitosana modificada com PEO e magnetita apresentam maior magnetização de saturação, isto pode ser atribuído à incorporação do polímero nas microcápsulas magnéticas e também ao tamanho das partículas, uma vez que é relatado na literatura que partículas menores apresentam melhores resultados.

4.4.4 - FORMULAÇÃO DE UM BIOCATALISADOR. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA, ATIVIDADE CATALÍTICA.

As enzimas foram immobilizadas utilizando tanto o método de encapsulamento como covalentemente no suporte (Q/Fe₃O₄).

Para a imobilização covalente foi previamente tratado o suporte com uma solução de glutaraldeído. O agrupamento amino foi utilizado para formar uma ligação imínica com o glutaraldeído que a sua vez se liga covalentemente com a Lipase (Figura 93).

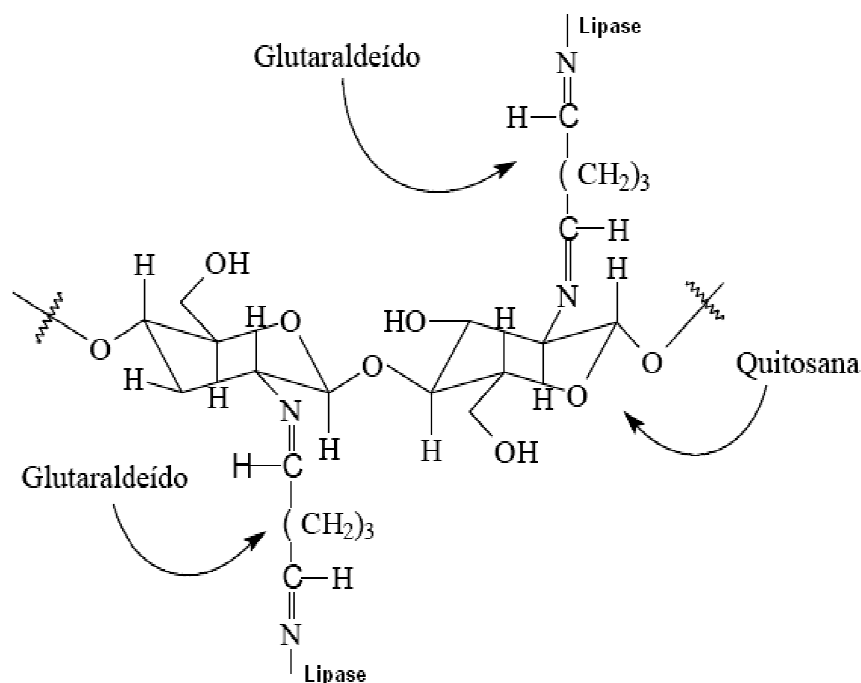


Figura 93 - Imobilização da Lipase no suporte de quitosana (Biochemical Eng. J. v.25, 15-23, 2005).

A imagem de MEV mostra o aspecto dos suportes após a imobilização covalente das enzima Lipase, na que a superfície das microcápsulas se mostram mais densas (Figura 94)

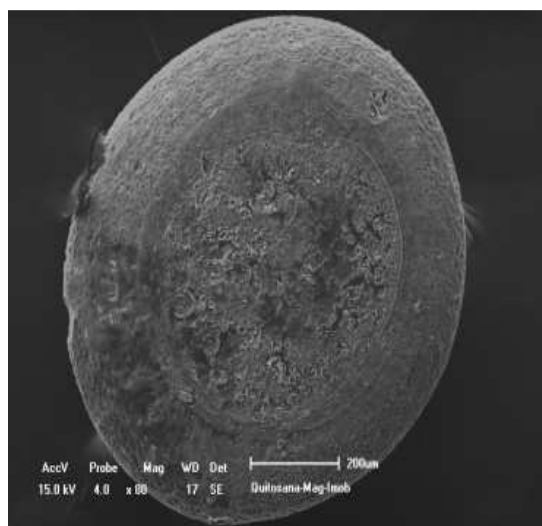


Figura 94 - Morfologia da microcápsula CS-Fe₃O₄-Gt-Lipase.

Resultados preliminares relativos a atividade hidrolítica da enzima (lipase) livre e imobilizada foram medidas utilizando uma emulsão do azeite de oliva, água e goma arábica. A quantidade de ácidos graxos livres liberados durante a hidrólise foi determinada pela titulação com solução de KOH.

A unidade de atividade da lipase (U) definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 mmol de ácido graxo do azeite por minuto nas condições de ensaio são apresentadas na Tabela 10 e 11.

Tabela 10 - Atividade Enzimática por adsorção física

<i>Derivados Imobilizados – adsorção física</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>	<i>Rendimento de Imobilização (%)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	304 U/g	12,45
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	252,7 U/g	10,35

Tabela 11 - Atividade Enzimática por ligação covalente

<i>Derivados Imobilizados – Ligação covalente</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>	<i>Rendimento de Imobilização (%)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	563,16 U/g	25,14
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	630,2 U/g	25,8

Nos suportes que foram imobilizados por adsorção física da Lipase, se observou uma atividade catalítica relativamente baixa para ambos os sistemas. O

menor rendimento do sistema Q-PEO/Fe₃O₄ parece estar associado a que os grupos hidroxilas terminais do PEO interagem na blenda preferencialmente com os grupos da quitosana formando ligações intermoleculares de hidrogênio ou que pode vir a diminuir a capacidade de imobilização do suporte.

A imobilização por adsorção física, em geral, apresenta baixos índices de rendimento por não haver nenhum tipo de ligação química entre suporte e a enzima.

As partículas Q/PEO/ Fe₃O₄ apresentaram uma baixa resistência mecânica e algumas se quebraram durante os tratamentos (agitação) ou que também contribuiu a diminuir o rendimento de imobilização.

A Tabela 12 mostra a atividade enzimática do sistema durante o período de imobilização, observa-se que tanto para as microcápsulas de Q/PEO/ Fe₃O₄ quanto Q/ Fe₃O₄ a diferença não foi significativa devido a uma baixa capacidade de adsorção da enzima ativa.

Tabela 12 - Atividade Enzimática das solução de imobilização durante o período de imobilização

<i>Derivados Imobilizados</i>	<i>Atividade do sobrenadante</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	4 horas	1304
	24 horas	995,6
	Tampão de lavagem	26
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	4 horas	1960
	24 horas	1656
	Tampão de lavagem	54

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- Os filmes de quitosana (80% acetilação) obtidos pela técnica de coagulação (80/20 m/m) apresentam baixa rugosidade (1.3 nm), 56,8 % de cristalinidade, temperatura de fusão em torno a 125°C e um coeficiente de permeabilidade ao vapor da água de $6,44 \times 10^{-7}$ Barrer, $4,89 \times 10^{-7}$ Barrer e $3,32 \times 10^{-7}$ Barrer , para as respectivas temperaturas 50°C, 55°C e 60°C.
- A adição de 20% m/m de PEO e dos copolímeros PE-b-80%PEO e PE-b-80%PEO-COOH à quitosana originou blendas homogêneas, miscíveis (AFM), com uma textura mais irregular e de maior rugosidade (60-93 nm) que o filme da quitosana. A adição do homopolímero e os copolímeros diminuíram a cristalinidade dos filmes em relação ao filme da quitosana (56,8%), principalmente na blenda com o copolímero PE-b-80%PEO-COOH (29% de fase cristalina). A temperatura de fusão da fase cristalina associada a quitosana apresentou uma leve diminuição nas blendas.
- Os filmes das blendas apresentaram permeabilidade inferior (mesma ordem de grandeza) ao filme da quitosana apesar de apresentar uma menor cristalinidade. Este comportamento foi justificado considerando a existência de interações entre os polímeros que formam a blenda o que originou uma modificação na interação do filme com o vapor da água e conseqüentemente no coeficiente de permeabilidade.
- Os filmes preparados com as blendas apresentaram capacidade térmica específica inferior que o filme da quitosana e os valores de difusividade térmica com valores crescentes nas blendas provavelmente associados a existência de domínio de maior mobilidade nas blendas como evidenciado no módulo de perda e na curva de tangente delta registrados nos ensaios de análise dinâmico mecânico.

- Os ensaios dinâmico mecânico (DMA), realizados com os filmes da quitosana e as blendas, mostram uma maior rigidez associada a quitosana a temperaturas acima de 10°C como consequência da formação de fase cristalina. Este fenômeno de cristalização se reduz nas blendas.
- Foram formuladas microcápsulas com a quitosana e as blendas objeto de estudo contendo entre 4-16% m/m de Fe_3O_4 em seu núcleo, utilizando a técnica de *spray drying* as quais apresentaram uma superfície rugosa, forma esférica e uma distribuição de tamanho de partícula entre 0,1-0,9 μm .
- Microcápsulas com a quitosana e a blenda Q/PEO forma formuladas com a técnica de coagulação considerando que estes sistemas apresentaram diferenças relevantes nas propriedades de transporte, rugosidade e cristalinidade entre outras quando formulados os filmes densos. As microcápsulas de quitosana e da blenda com PEO apresentaram um formato esférico com uma maior porosidade nas microcápsulas de quitosana.
- As distribuições de tamanho das microcápsulas são próximas, entre 400-600 μm na quitosana e entre 500-800 μm na blenda, ambas com carga de Fe_3O_4 próxima a 50% m/m.
- As propriedades magnéticas das microcápsulas, tanto para quitosana como para a blenda indicam que os suporte formulados têm uma rápida resposta quando aplicado um campo magnético. Os suportes Q/ Fe_3O_4 e Q/PEO/ Fe_3O_4 não permaneceram magnetizados após retirada do campo magnético. O suporte Q/PEO/ Fe_3O_4 apresentou uma magnetização (1,05 meu/g) maior que o suporte Q/ Fe_3O_4 .
- A imobilização da enzima lipase foi realizada utilizando os suportes Q/ Fe_3O_4 e Q/PEO/ Fe_3O_4 por adsorção física e covalentemente utilizando o glutaraldeído. Os testes preliminares de atividade hidrolítica da enzima indicaram uma maior atividade nas condições de análise para as enzimas imobilizadas covalentemente e quando utilizado o suporte Q/PEO/ Fe_3O_4 .

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCALDE, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A. *Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes*. TRENDS in Biotechnology, n.6, 2006, p.281-287.

ALVES, A. C., Cardoso, J. F., Almeida, M. A. P., Melo, C. K., Louzeiro, H. C. (2005) *Reaproveitamento de lípase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu*. Biodiesel o Novo Combustível do Brasil, 2005, p. 85-89.

AMIJI, M. M. *Permeability and blood compatibility properties of chitosan – poly(ethylene oxide) blend membranes for haemodialyses*. Biomaterials, v.16. p.593-599, 1995.

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

ARCIDIACONO, S.; Kaplan, D.L. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 39, 281 – 286.

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

BORDE, B. et al. *Calorimetric analysis of the structural relaxation in partially hydrated amorphous polyssacarides I Glass transition and fragility*. Carbohydrate Polymers, v.48, p. 83-96, 2002.

BREITENBACH, A. Mohr D., Kissel T., (2000). *Biodegradable Semi-crystalline Comb Polyesters Influence the Microsphere Production by Means of a Supercritical Fluid Extraction Technique (ASES)*. Journal of Controlled Release 63, 53-68.

BRUGNEROTTO. J. et AL. *Na infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization*. Polymer, v.42, p. 3569-3580, 2001.

CAMARGO, F. A. *Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli(3-hidroxibutirato-co-valerato)/(PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar*. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Campinas – SP, Universidade de Campinas – UNICAMP, 2003.

CANEVAROLO Jr., S. V. *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. São Paulo: Artliber, 2002, p.184.

CARVALHO, Tecia Vieira., *Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo*. Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CASTILLO, T. E., *Biossíntese e Caracterização de um Elastômero Biodegradável a partir de Recursos Renováveis*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Tese de Doutorado, 2002, p. 68-70.

CASTRO, N., .A.Witt., A.T.Pires. *Preparação de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas com H₂SO₄ para aplicação como condutores protônicos*. 2008, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

CHANG, J., Xião, B., Chen, Y., Fu, Y., L, P., Wang, X. *Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor*. Energy Conversion and Management, n. 50, 2009, p. 668-673.

CHEN. Xuesi, et al. *Miscibility studies of the blends of chitosan with some cellulose ethers*, Carbohydrate Polymers, 2005, p. 1-7.

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

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

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.

CYPRINANO, G.T.N. Membrans de quitosana macro e microporosa: preparo caracterização e permeabilidade. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. 2008.

DALLAN, Paula Rulf Marreco. *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele*, Tese de Doutorado, UNICAMP – Campinas, São Paulo, 2005.

DONADEL. K , M. D.V. Felisberto, V T. Fávere, M Rigoni, N. J. Batistela, M. C.M. Laranjeira. *Synthesis and characterization of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer*. Materials Science and Engineering C 28 (2008) 509–514.

DUARTE, E. L. *Estudo de Fases Termotrópicas por Microscopia Óptica, Medidas de Densidade, Entálpicas e Espalhamento de Raios X*, Dissertação de Mestrado, USP/IF, São Paulo, 2000.

DUARTE, M. L., et AL. *An optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy*. Int. J. Biol. Macromol., v31, p. 1-8, 2002.

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

El-Hadi, A., Schanabel, R., Straube, E., Muller, G., Henning, S. *Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. Polym. Test.*, v.21, p.665-674 (2002).

ELIGIO, T. C., Sánchez, R. *Characterization of poly (3-hydroxyalkanoate) chemically modified and its performance as matrix for hormone release. Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, n. 270, 1999, p. 69-75.

ETTAYEBI, K., Yamani, J. E., Ettayebi, M., Jamai, L. *Production of ethanol from starch by free and immobilized Candida tropicalis in the presence of α -amylase. Bioresource Technology*, n. 98, 2007, p. 2765–2770.

FONTINELES. T.A., Souza.A A., C.M.L.,Silva.Cp., Moita Neto.J.M. *Interação entre polioxido etileno e quitosana.CBQ*, (2006).

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.

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.*

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

GILMORE, D. F., Fuller, R. C., Lenz, R., *“Biodegradations of Poly(Beta-Hydroxy Alkanoates), in Degradable Materials: Perspectives, Issues and Oppurtunities, Barenerg, S. A.; Brash, J. L.; Narayan, R., and Redpath, A. E., Eds. CRC Boston,pp. 481-514 (1990).*

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.

GUIMARÃES, A. F. X. S. *Catalisadores heterogéneos para a produção de biodiesel metanólise do Óleo de Soja sobre Hidrotalcites de Magnésio e Alumínio Modificadas*. Tese (Mestrado) – Instituto Superior Técnico Universidade Técnica de Lisboa – IST. 75p. Lisboa, 2007.

HIRANO, S. ; *Biotech. Ann. Res.* 1996, 2, 237 – 258.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/431079>.
[acessado em 10/05/2007](#).

HUANG, S. J., and Edelman, P. G., *An Overview of Biodegradable Polymers and Biodegradation of Polymers, in Degradable Polymers : Principles and Applications.*, Scott, G., and Gilead, D., Eds., Chapman & Hall, Chapter 2, p.18-28, (1995).

IKEJIMA. T., Y. Inoue. *Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(3 – hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan*, Carbohydrate Polymers, 2000,vol. 41, p. 351-356.

ISO, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S. *Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase*. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, n. 16, 2001, p. 53–58.

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.

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.

LEITE, H. M. E. *Formulação e Caracterização de Matrizes de Polihidroxibutirato para Liberação Controlada de Fármacos*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Tese de Mestrado, 2004, p.20.

LIMA, I. , Emerson S. Ribeiro e Claudio Airoidi. *O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno*. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 3, 501-506, 2006.

LIMA, Ilauro de Souza. *Quitossanas, quitosana química e quitossanas morfológicamente modificadas com anidrido succínico: propriedades, adsorção e termoquímica.*, Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Campinas – SP, Universidade de Campinas – UNICAMP.

LIU, C., Wang, F., Ou-Yang, F. *Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized Saccharomyces cerevisiae in magnetic particles*. *Bioresource Technology*, n. 100, 2009, p. 878–882.

LOPEZ, F.E, et al. *A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan*. *J.Therm. Anal.Cal.* v.91.p633-639. 2008.

LUCAS, E. F., Soares, B. G., Monteiro, E. *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso molecular e Análise Térmica*, Rio de Janeiro: E-papers, 2001, p. 366.

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

MADDEVER, W. J., and Campbell, P. D., “*Modified Starch Based Environmentally Degradable Plastics,*” in *Degradable Materials: Perspectives, Issues and Opportunities*, Barengerg, S. A.; Brash, J. L.; Narayan, R., and Redpath, A. E., Eds. CRC Boston, pp. 237-262 (1990).

MAJETI, N.V., Kumar R., *A review of chitin and chitosan applications*, *Reactive & Functional Polymers*, 2000, vol.46, p.1-27.

MASSON, J. F., and Manley, R. St. John, "Solid-state NMR of some cellulose/synthetic polymer blends". *Macromolecules.*, v.25,589-592 (1992).

MINTEER, S. D., Cooney, M., Sjöholm, K. H. *Effects of degree of deacetylation on enzyme immobilization in hydrophobically modified chitosan.* *Carbohydrate Polymers*, n. 77, 2009, p. 420–424.

MURAT, Y. E. *Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres.* *Biomaterials*, n. 16, 1995, p.157-1161.

MUZZARELLI, R. A. A.; et al. *Polimeri in Medicina*, XX Convegno-Scuola, Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Villa Fetrinelli, 1997, 307 – 336.

NASCIMENTO, M. G., Soldi, V., Dalla-Vecchia, R. *Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros.* *Química Nova*, v. 4, n. 27, 2004, p. 623-630.

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

NUNES, S. P. e Inoue, T., *Evidence for spinodal decomposition and nucleation and growth mechanisms during membrane formation,* *J. Membrane Sci.*, v.111, p.93-103 (1996).

OLIVEIRA, L. G., Mantovani, S. M. *Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas.* *Química Nova*, n.3, 2009, p.742-756.

ORNUM, J. V. *Infofish Int.* 1992, 6, 48 – 52.

PARIZE ,A. L. , Hellen K. Stulzer, Mauro C. M. Laranjeira, Inês M. C. Brighente. Tereza C. R. S. Desenvolvimento de Microcápsulas de Quitosana contendo Cúrcuma pelo método de Spray Drying e Reticuladas com Tripolifostato de Sódio.

Anais do 10o Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009

PETER, M. G.; J.M.S. – *Pure Appl. Chem.* 1995, 4, 629 – 640.

POLEY, L. H.D.,(2003) *Aplicações de técnicas fototérmicas ao estudo de propriedades físicas de polímeros biodegradáveis*. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) Campos dos Goytacazes – Rj. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 101p.

POUTON, C. W., Akhtar, S. *Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery*, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v.18; p.133-162 (1996).

PRAPAGDEE. B. et al. *The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by fusarium solani f. SP. Glycines*. *Bioresour Technol.*,v98, p.1353=1358, 2007.

PRASHANTH, K. V. H. ; Tharanathan. R. N. *solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions*. *Carbohydr. Polym*, v.50, p.27-33, 2002.

RAMPIN, M. A., Hurtado, C. R., Dabdoub, M. J. *Síntese de Ésteres etílicos a partir de óleos vegetais utilizando lípase imobilizada de Thermomices lanuginosus*. Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química 29, Àguas de Lindóia-São Paulo, 2006.

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.

RIM, J. W. et AL. *Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity*. *J.Agric. Food Chem.* V54, p.5814-5822.2006.

RITTHIDEJ, G. C., Phaechamud, T., & Koizumi, T. *Moist heat treatment*

on physicochemical change of chitosan salt films. International Journal of Pharmaceutics, 232, 11–22. 2002.

ROY, René., et al. *Chemical Modification of Chitosan. 10. Synthesis of Dendromized Chitosan – Sialic Acid Hybrid Using Convergent Grafting of Preassembled Dendrons Built of Gallic Acid and Tri(ethylene glycol) Backbone,* Macromolecules, 2001, Vol. 34, 3905 – 3909.

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.

SÁNCHEZ, R., Galego N. *Characterization and application of poly- β -hydroxialkanoates family as composite biomaterials.* Polymer Testing, n. 19:485-492.

SÁNCHEZ, R., Galego N. *Physical and functional characterization of PHAscl membranes.* Polymer, n. 43, 2002, p. 3109-3114.

SÁNCHEZ, R., Martin, M., Miguens, F., Rieumont, J. *Morphological study of polymeric microparticles obtained by oil-water emulsion by SEM.* Acta Microscopica, n.6, 1997, p.288.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G. Vargas, H. *Photoacoustic Monitoring of Internal Plastication in Poly (3-hydroxybutirate-co-hydroxyvalerate) Copolymers: Measurements of Thermal Parameters.* Journal Braz Chem Soc, n. 10, 1999, p. 97-103.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G., Sthel, M., Gonçalves, S. S., Schramn, D. U., Briones, J. R., Vargas, H. *Characterization of Poly-3-hydroxy octanoate using Photothermal Methods.* Review of Scientific Instruments, Estados Unidos, n.74, 2003, p.831-833.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G., Vargas, H., Siqueira, M. O., Poley, L. H. *Water and*

vapors permeability at different temperatures of poly-3-hydroxybutyrate dense membranes. *Polímeros - Ciência e Tecnologia*, n.15, 2004, p.22-26.

SASHIWA, Hitoshi, Sei-ichi Aiba. *Chemically modified chitin and chitosan as biomaterial*, *Progress in Polymer Science*, 2004, vol. 29, p.887-908.

SASHIWA, Hitoshi., et al. *Highly Convergent Synthesis of Dendrimed Chitosan – Sialic Acid Hybrid*, *Macromolecules*, 2001, Vol. 34, 3211 – 3214.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa. *Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins*, *Carbohydrate Polymers*, 1999, vol. 39, p. 127-138.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., R. Roy. *Chemical modification of chitosan. Part 9: Reaction of N-carboxyethylchitosan methyl Ester with diamines of acetal ending PAMAM dendrimers*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 47, p. 201-208.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., René Roy. *Chemical modification of chitosan 11: chitosan hybrid as tree like molecule*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 49, p. 195-205.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., René Roy. *Chemical modification of chitosan 8: preparation chitosan - dendrimer hybrid via short spacer*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 47, p. 191-199.

SELLIN, N., (2002) *Análise da Superfície de Polímeros Pós-Tratamento Corona*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) 78p.

SIGNINI, R.e Campana filho, S.P. *Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato*. *Polímeros*, v.11, n.2, São Carlos, 2001.

STROPNIK, C., Germic, L. e Zerjal, B., *Morphology variety and formation mechanisms of polymeric membranes prepared by wet phase inversion*. *J. Appl. Polym. Sci.*, v.61, p.1821-1830(1996).

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

TAN, T., Wang, F., Xie, F., Nie, K., Lu, J. *Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized Candida sp.* 99-125. *Process Biochemistry*, n. 42, 2007, p. 1367–1370.

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

Ullmann'sa Eyclopedia of Industrial Chemistry. 5th Edition, VCH: Germany, v.A16, p.187-258 (1986).

Ullmann'sb Eyclopedia of Industrial Chemistry. 5th Edition, VCH: Germany, v.A21, p.273-304(1986).

UTRACKI, L. A., *Introduction to Polymer Alloys and Blends e Polymer- Polymer Miscibility in "Polymer Alloy and Blends: Thermodynamics and Rheology"*, Hanser Publishers, New York, (1990).

UTRACKI, L.A., *Polymer Alloys and Blends*, Handbook of Polymer Science and Technology, ed. Nicholas P. Cheremisinoff, New York, v.4 p.121-202, (1989).

UTRACKI, L.A., *Polymer Alloys and Blends-Thermodynamics and Rheology*; Munich, Carl Hanser Verlag Publishers, (1989).

VERHOOGT, H., Ramsay, B. A., Favis, B. D. *Polymer Blends containing poly(3-hydroxybutarate)*. *Polymer*, v.35, no 24, p 5155-5169 (1994).

WU, W., Chiou, S., Giridhar, R., Hung, T. *Binary immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 26, 2003, p. 69–78.

XI-Guang Chen, Cheng-Sheng Liu, Chen-Guang Liu, Xiang-Hong Meng, Chong M. Lee, Hyun-Jin Park. *Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial*, *Biochemical Engineering Journal* 2006, vol. 27, p. 269–274.

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.

ZHANG, M.; Li, X.H.; Gong, Y.D.; Zhao, N.M. e Zhang, X.F. *Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG*. *Biomaterials*, v.23, p.2641-2648, 2002.

ZONG, M., Wu, H., Li, N. *Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from Penicillium expansum*. *Process Biochemistry*, n. 44, 2009, p. 685–688.

**MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO
COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS**

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Dezembro, 2009**

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

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 Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

**CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
Dezembro 2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do CCT / UENF

59/2011

Santos, Érica Marques da Silva

Modificação e caracterização da quitosana para uso como suporte em processos biotecnológicos / Érica Marques da Silva Santos. – Campos dos Goytacazes, 2009.

xxi, 171 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, 2009.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodriguez.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos.

Bibliografia: f. 153-164.

1. Quitosana 2. Biotecnologia 3. Microcápsulas magnéticas I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais

MODIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA PARA USO COMO SUPORTE EM PROCESSOS BIOTECNOLÓGICOS

ÉRICA MARQUES DA SILVA SANTOS

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 Doutora em Engenharia e Ciência dos Materiais.

Comissão Examinadora:

Dsc. Gustavo Wagner de Menezes(Engenharia e Ciências de Materiais) – IFF-RJ

Dsc. Ana Lúcia Diegues Skury(Engenharia e Ciências de Materiais) –
UENF/CCT/LAMAV

Dsc.Tereza Elígio (Engenharia e Ciências de Materiais) – UENF/CCT/LAMAV

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

Dedico este trabalho ao meu filho Gustavo, meu esposo Valdecir e aos meus pais Abelar e Adenir por todo o, incentivo, confiança, apoio e carinho durante todo o tempo.

A meu filho Gustavo, como demonstração de amor e prova de que: querer é poder.

A meu esposo, amigo e companheiro por sua confiança, estímulo e apoio em todos os momentos.

A meus pais Abelar e Adenir, que sempre acreditaram em mim. E, me iniciaram no conhecimento e transmitiram a importância do saber e dignidade.

AGRADECIMENTOS

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

“Deus sabe ... Quando estou cansada e desencorajada por esforços que não deram frutos. Deus sabe quando tentei... Quando chorei por longo tempo com o coração cheio de angústia. Ele contou minhas lágrimas. Quando sinto que a vida está perdida e que muito tempo se perdeu Ele me conforta... Quando estou solitária e meus amigos estão muito ocupados para um simples telefonema Ele me acompanha... Quando sinto que já tentei de tudo e não sei por onde remeçar Ele tem a solução... Quando nada mais faz sentido e sinto frustrada e deprimida Ele tenta me mostrar respostas... Quando tudo parece mais brilhante e percebo uma luz de esperança, nesse momento Ele soprou nos meus ouvidos. Quando as coisas vão bem e tenho muito para agradecer Ele está festejando comigo... Quando algo me traz muita alegria e me sinto fortalecida Ele está sorrindo para mim... Quando tenho um propósito a cumprir e um sonho para seguir Ele abre meus olhos e me chama pelo nome... Onde eu estiver seja na alegria e na tristeza, mesmo que ninguém mais saiba, DEUS sabe...”

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

“A verdadeira vida não é constituída de currículos, homenagens ou mesmo conquistas que aumentam o nosso intelecto; mas sim de essência humana. A maior mensagem que posso deixar cravada na minha vida é a maneira pela qual vou vive-la. Minha vida será a sua homenagem.” Minha eterna gratidão!

Ao meu filho Gustavo pela compreensão da minha ausência e pouco tempo para dar-lhe atenção, é uma criança iluminada.

“A você que mesmo tão pequeno se mostrou um gigante, me ensinado que, quem ama não impõe limites ou condições. A você que, em cada despedida, deixava transparecer nos olhos a tristeza, apesar do esforço em esboçar um sorriso consolador. A você que minha eterna gratidão e amor. Você é a luz da minha vida, te Amo!!!

Ao meu esposo Valdecir, pelo carinho, companheirismo, compreensão e apoio, sabendo entender todas as vezes em que tive que ausentar mesmo estando perto.

“A você que esteve comigo todo esse tempo, que sofreu comigo a cada adeus e escutou as histórias mais mirabolantes da minha fase de deslumbramento, ficará eternamente em meus pensamentos e coração. A você, meu amor, que soube suportar com firmeza o tempo e a distância, constituindo um modelo de dedicação e fidelidade. A você que, em cada despedida, deixava transparecer nos olhos a tristeza, apesar dos lábios tentarem esboçar um sorriso consolador, devo a alegria deste momento. Agradeço pelos votos de confiança em mim depositados, que me fizeram crescer e não desistir no meio do caminho.” Amo você!!!

Aos meus pais Abelar, Adenir e meu irmão Éric, minha cunhada Jaqueline e meu sobrinho Lucas, pela paciência, apoio nos momentos difíceis, pelo amor e carinho sempre concedidos.

“A vocês que valorizaram meus sonhos, quando eu mesma não acreditava neles; que me encorajaram a ir mais adiante, quando o medo me fazia hesitar; que me aplaudiram e se emocionaram com cada batalha vencida, os meus mais profundos agradecimentos.

No mérito de minha conquista há muito de suas presenças.

Companhia, sorrisos, palavras e carinho foram expressões de amor profundo e armas desta vitória.

As alegrias de hoje também são suas. Meu carinho e minha gratidão.”

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

Aos professores do Laboratório de Materiais Avançados.

À Luciana Lezira paras análises de raios X e microscopia eletrônica de varredura.

À Márcia Benzi pelas análises de IFTR, no IMA –UFRJ.

Ao Professor Marcelo Gomes pelas análises de fotoacústica.

À todos os funcionários do Laboratório de Materiais Avançados.

Aos colegas de curso, Camila, Karina pelas análises de permeabilidade, Djalma pelas análises de AFM e apoio na solução de problemas, Álvaro pelo apoio na realização dos experimentos, Paula pela prazerosa convivência.

“A todos vocês que estiveram comigo, nos dias mais anônimos, nas horas simples, a todos os pequenos gestos, as pequenas atenções; a todos que contribuíram para a construção desta vitória, o meu carinho, reconhecimento e gratidão.”

Aos meus amigos, Diego, Bruno, Sarah, Karine e Amanda pela compreensão, apoio e carinho durante todo tempo.

“A vocês que valorizaram meus sonhos, quando eu mesma não acreditava neles; que me encorajaram a ir mais adiante, quando o medo me fazia hesitar; que me aplaudiram e se emocionaram com cada batalha vencida, os meus mais profundos agradecimentos.

No mérito de minha conquista há muito de suas presenças.

Companhia, sorrisos, palavras e carinho foram expressões de amor profundo e armas desta vitória.

As alegrias de hoje também são suas. Meu carinho e minha gratidão.”

À minha prima e irmã, Dulce por estar sempre presente em minha vida, dando a meu filho carinho e amor de mãe e me ajudando a resolver os diversos imprevistos de acontecem.

À Myrian minha amiga e irmã de coração por estar sempre presente, dando ao meu filho todo carinho e amor de mãe.

Em especial à uma grande amiga, Elaine Carvalho pela amizade, companheirismo, hospitalidade e acolhida, estando sempre pronta a me ajudar, sua ajuda foi fundamental para a realização deste trabalho.

“Depois de algum tempo a gente aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida. E que bons amigos são a família que nos permitiram escolher.” (William Shakespeare)

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

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	1
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	10
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES:.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT	15
CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	16
1.1-OBJETIVOS:.....	19
1.1.1 - OBJETIVOS GERAIS.....	19
1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	19
1.2-JUSTIFICATIVAS:.....	20
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
2.1 – POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS	21
2.2 - QUITOSANA.....	22
2.3 - FONTES DE QUITINA E QUITOSANA.....	24
2.4- ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITINA E QUITOSANA	25
2.5 – APLICAÇÕES GERAIS DA QUITOSANA	28

2.6 – MISTURAS POLIMÉRICAS	30
2.7 - COMPATIBILIDADE.....	31
2.8 – MISCIBILIDADE	33
2.8.1 - TERMODINÂMICA E MISCIBILIDADE	35
2.8.2 - BLENDS POLIMÉRICAS.....	36
2.8.2.1 - ASPECTOS GERAIS	36
2.8.2.2 - MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE BLENDS POLIMÉRICAS	37
A) BLENDS EM SOLUÇÃO:	37
B) MISTURA MECÂNICA:.....	38
C) MISTURA REATIVA:	38
D) MISTURA DE LÁTEX:	39
E) POLIMERIZAÇÃO <i>IN SITU</i> :.....	39
2.8.3 - MORFOLOGIA DE BLENDS POLIMÉRICAS:.....	39
2.8.4 - APLICAÇÕES GERAIS DE BLENDS POLIMÉRICAS A PARTIR DA QUITOSANA	42
2.9 - BLENDS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM OUTROS POLÍMEROS ...	43
2.9.1 - BLENDS DE POLIHIDROXIBUTIRATO /QUITINA E QUITOSANA.....	43
2.9.2 - BLENDS DE QUITOSANA COM ÉSTERES DE CELULOSE	45
2.9.3 - BLENDS DE QUITOSANA COM CELULOSE	48

2.10 – MATERIAIS MAGNÉTICOS	51
2.10.1 - CURVAS DE MAGNETIZAÇÃO.....	52
2.11 – BIODIESEL	54
2.11.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL.....	55
2.11.2 – PROCESSOS CATALÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL.....	61
2.12 – BIOCATALISADORES	64
2.13 – IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS.....	64
2.14 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO.....	66
- LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE	67
- LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA	68
- ADSORÇÃO.....	68
- CONFINAMENTO EM MATRIZ OU EM CÁPSULAS.....	70
2.15– POLÍMEROS NATURAIS UTILIZADOS COMO SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO.....	74
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	81
3.1 – MATERIAIS.....	81
3.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA.....	81
3.2.1 – OBTENÇÃO DAS BLENDS POLIMÉRICAS.....	82
3.2.1.1 - PREPARAÇÃO DA QUITOSANA	82

3.2.2 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLIÓXIDO ETILENO.....	83
3.2.3 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLI(ETILENO - CO - ÓXIDO ETILENO) E POLI(ETILENO - CO - ÓXIDO ETILENO) MODIFICADO.....	84
3.3 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E BLENDA.....	85
3.3.1 - CARACTERIZAÇÃO POR FTIV.....	85
3.3.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	86
3.3.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV.....	88
3.3.4- ANÁLISE DE PERMEABILIDADE POR GRAVIMETRIA.....	88
3.3.5 - CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA.....	90
3.3.6 – CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X.....	91
3.3.7 – CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA.....	95
3.4 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA - NÚCLEO.....	97
3.4.1 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMAGNETITA (NÚCLEO).....	97
3.4.2 – PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE <i>SPRAY-DRYING</i>	97
3.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM O NÚCLEO DE NANO-MAGNETITA.....	100
3.5.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	100
3.5.2 – POROSIDADE.....	101

3.5.3 – MEDIDAS DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETÔMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE.....	102
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	104
4.1 – CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA.....	104
4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QUITOSANA	104
4.1.2 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DE QUITOSANA.....	106
4.1.3 – ESTRUTURA DA QUITOSANA: ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.....	107
4.1.4 – COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE DA QUITOSANA.....	108
4.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: BLENDS.....	109
4.2.1 – MORFOLOGIA DAS BLENDS.....	109
4.2.2 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA CRISTALINIDADE. .	116
4.2.3 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: INTERAÇÕES ENTRE AS FASES POLIMÉRICAS.....	117
4.2.4 – TRANSPORTE DE MASSA: PERMEABILIDADE	118
4.2.5 – DIFUSIVIDADE TÉRMICA	123
4.1.7 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TÉRMICA	125
4.2.7 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO E MECÂNICO DA QUITOSANA E SUAS BLENDS.	127
4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS MAGNÉTICAS A PARTIR DA QUITOSANA OBTIDAS POR <i>SPRAY DRYING</i>	130

4.3.1 – ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.	131
4.3.2 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCAPSULAS PREPARADAS COM A TECNICA DE <i>SPRAY DRYING</i>	134
4.3.2 – POROSIDADE	140
4.4 – MICROCAPSULAS MAGNETICAS DE QUITOSANA FORMULADAS PELA TECNICA DE COAGULAÇÃO	143
4.4.1 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO.	143
4.4.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA E CARGA DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.	144
4.4.3 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS MICROCAPSULAS DE QUITOSANA E A BLENDAS COM PEO CONTENDO NÚCLEOS DE Fe_3O_4	146
4.4.4 - FORMULAÇÃO DE UM BIOCATALISADOR. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA, ATIVIDADE CATALÍTICA.....	148
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	151
CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	153

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura dos polímeros: celulose, quitina e quitosana.	23
Figura 2 - Principal diferença entre as estruturas de celulose, quitina e quitosana.	25
Figura 3 - Representação do arranjo das cadeias poliméricas das quitinas conhecidas: a) α b) β e c) γ	26
Figura 4 - Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica dos polímeros: quitina (NHCOCH ₃), quitosana (NH ₂) e forma modificada (R).	27
Figura 5 - Derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação.	29
Figura 6 – Representação de um sistema de duas fases por DMA.	32
Figura 7 - Diagrama de fases para um sistema binário.	40
Figura 8 - Diagrama de fases para um sistema ternário demonstrando as curvas binodal e spinodal e o ponto crítico.	41
Figura 9 - Difração de raio – x dos filmes de PHB, α -quitina e quitosana, das blendas PHB/ α -quitina e PHB/quitosana: (a) PHB/ α -quitina; (b) PHB/quitosana.	43
Figura 10 - DMTA do PHB, α – quitina, quitosana e as blendas: (a) PHB/ α – quitina; (b) PHB/quitosana.	45
Figura 11 - Difratogramas de CH/HPMC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of HPMC, (b) difratogramas de CH/MC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of MC.	47
Figura 12 - Tensão “ <i>strangth</i> ” da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	48
Figura 13 - Módulo de armazenamento (e') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	49
Figura 14 - Módulo “ <i>loss</i> ” (E'') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.	49
Figura 15 - Dependência da temperatura dos valores da Tg δ para a celulose, quitosana e quitosana/celulose.	50
Figura 16 - Representação ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais anti - e ferromagnéticos.	52
Figura 17 - Esquema ilustrativo da movimentação das paredes de domínio de uma amostra desmagnetizada submetida a um campo externo variável.	53
Figura 18 - Representação qualitativa de um ciclo de histerese.	53
Figura 19 - Esquema resumida da produção de biodiesel.	54
Figura 20 – TLC de 0 a 72 horas da mistura reacional da reação de etanolise do óleo de soja para a produção de biodiesel.	58
Figura 21 – Estabilidade da lipase imobilizada por repetidos ciclos.	59
Figura 22 – 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)	60
Figura 23 – Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento <i>et al.</i> , 2004).	66
Figura 24 – Imobilização de enzimas sobre suporte.	68
Figura 25 – Método de imobilização de enzima por adsorção em um suporte inerte	69
Figura 26 – Representação esquemática da preparação do apoio e imobilização da lipase por adsorção (Xu <i>et. al.</i> , 2007).	70
Figura 27 – Imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento.	71
Figura 28 – Microscopia eletrônica (a) corte transversal (b) superfície, esferas de quitosana a 2,0%(m/v).	72
Figura 29 – Fotos da microscopia da lipase encapsulada com o núcleo líquido no meio rodeado por uma matriz de k-carragenina.	73
Figura 30 – Ilustração esquemática da preparação de aminoácidos modificando esferas de quitosana e imobilização de enzimas.	75
Figura 31 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microcápsulas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído.	76
Figura 32 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microcápsulas magnéticas da quitosana (Huang <i>et. al.</i> , 2005).	76

Figura 33 – Microscopia eletrônica quitosana em pó (40 x), (b) FP / QUIT / GLU 0,025 (x 2000), (c) CA / Chit / GLU 0,025 (400 x), e (d) CA / Chit (1000 x) (Foresti et. al., 2007).....	78
Figura 34 – Micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana	79
Figura 35- Esquema ilustrativo do modo de varredura do AFM para a obtenção dos parâmetros de rugosidade	87
Figura 36 - Sistema tipo “copo de Payne” utilizado para medidas de transporte de massa.	89
Figura 37 - Difrátometro marca Shimadzu modelo XRD 7000, utilizado para as análises.	94
Figura 38 - Esquema do microfone de eletreto.....	95
Figura 39 - Processo para formulação das microcápsulas pela técnica de segam por pulverização (<i>spray drying</i>).....	99
Figura 40 - Magnetômetro de Amostra Vibrante marca OXFORD VSM, Modelo 3001 utilizado para as análise.....	103
Figura 41 - Imagens MEV da superfície do filme de quitosana (a) e da seção transversal do filme de quitosana (b).	105
Figura 42- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de quitosana com 20µm x 20µm de área.	105
Figura 43 - Microscopia de força atômica mostrando morfologia da superfície do filme denso de quitosana com 2µm x 2µm de área.	106
Figura 44- Difrátograma do filme de quitosana neutralizado.	106
Figura 45 - Espectro de infravermelho (ATR) da quitosana.	107
Figura 46 - Curva de tempo de retardo para o filme de quitosana utilizando água como permeante a diferentes temperaturas.....	108
Figura 47 – Imagens de MEV: (a) Superfície e (b) Seção transversal no filme de Q/PEO (80/20).	109
Figura 48 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PEO com 20µm x 20µm de área.	110
Figura 49 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PEO com 25µm x 25µm de área.	110
Figura 50- Imagens de MEV: (a) superfície e (b) seção transversal do filme de Q/ PE-B-80%-PEO (80/20).	111
Figura 51 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.	111
Figura 52 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.	112
Figura 53 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-B-50%-PEO (80/20) e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-50%-PEO.	112
Figura 54- Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com 20µm x 20µm de área.	113
Figura 55- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com 20µm x 20µm de área.	113
Figura 56 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-b-PEO-COOH e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-PEO-COOH.	114
Figura 57- Microscopia de força atômica mostrando a topografia do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.....	114
Figura 58 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.....	115
Figura 59 - Difrátograma dos filmes de quitosana pura (a), Q/PE-B-50%-PEO (b), Q/PE-B-80%-PEO (c), Q/PE-B-PEO-COOH (d) e Q/PEO (e).....	116
Figura 60- Espectros de infravermelho (ATR) da quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros PE-PEO.	118
Figura 61- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C	119
Figura 62- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PE-b-80%PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°	119
Figura 63- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a Q/PE-b-80%PEO-COOH nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C	120
Figura 64- Coeficiente de permeabilidade em escala logarítmica versus o inverso da temperatura	122

Figura 65- Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PEO.....	124
Figura 66 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO.	124
Figura 67 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO-COOH.....	125
Figura 68- Evolução da temperatura com o tempo para as blendas.....	126
Figura 69 - Curvas de DSC para os filmes de quitosana e suas blendas.....	127
Figura 70- Módulo de armazenamento (E') para a quitosana e blendas.....	128
Figura 71- Módulo de perda para quitosana e blendas.	129
Figura 72-Tangente de delta para quitosana e blendas	130
Figura 73- Análises termogravimétricas para as microcápsulas com núcleo de Fe ₃ O ₄	132
Figura 74 - DTG das microcápsulas de quitosana com núcleo de magnetita	133
Figura 75 - Micrografia eletrônica de varredura das microcápsulas Q/Fe ₃ O ₄	134
Figura 76 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas – Q/ Fe ₃ O ₄	135
Figura 77 - Modificação da quitosana com trifosfato de sódio (TPF)	135
Figura 78- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/TPF/ Fe ₃ O ₄	136
Figura 79 -Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/TPF/ Fe ₃ O ₄	136
Figura 80 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das micropátulas Q/PEO/Fe ₃ O ₄	137
Figura 81-Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/PEO/ Fe ₃ O ₄	137
Figura 82- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b- PEO80/Fe ₃ O ₄	138
Figura 83 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/Fe ₃ O ₄	138
Figura 84 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO- COOH/Fe ₃ O ₄	139
Figura 85 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/Fe ₃ O ₄	139
Figura 86 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/Fe ₃ O ₄	141
Figura 87 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/TPF/Fe ₃ O ₄	142
Figura 88 - Microcápsulas de Q/Fe ₃ O ₄ (a) concentração 2% e (b) concentração 3%	143
Figura 89 - Microcápsulas de Q/Fe ₃ O ₄ /PEO (a) concentração 2% e (b) concentração 3%	144
Figura 90 - Curvas termogravimétricas das microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada com PEO.	145
Figura 91 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/ Fe ₃ O ₄	146
Figura 92 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/PEO/ Fe ₃ O ₄	147
Figura 93 - Imobilização da Lipase no suporte de quitosana (Biochemical Eng. J. v.25, 15-23, 2005).	148
Figura 94 - Morfologia da microcápsula CS-Fe ₃ O ₄ -Gt-Lipase.	149

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.....	115
Tabela 2 - Cristalinidade das blendas de quitosana.....	117
Tabela 3 - Tabela de coeficientes de permeabilidade das blendas (inéditos não disponíveis na literatura).....	121
Tabela 4 Energias de ativação da permeação a água para as blendas de quitosana.....	123
Tabela 5 - Propriedades térmicas das blendas obtidas através das propriedades fototérmicas.....	126
Tabela 6 - Temperaturas de fusão da quitosana e suas blendas.....	128
Tabela 7 - Parâmetros utilizados na obtenção de microcápsulas de quitosana.....	131
Tabela 8 - Porcentagem de magnetita e água nas microcápsulas.....	132
Tabela 9 - Dados de volume e área superficial para as microcápsulas.....	140
Tabela 10 - Atividade Enzimática por adsorção física.....	149
Tabela 11 - Atividade Enzimática por ligação covalente.....	149
Tabela 12 - Atividade Enzimática das solução de imobilização durante o período de imobilização.....	150

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações:

CH - Quitosana

AC – Acetato de celulose

AAc – Àcido acrílico

TPF – Tripolifosfato de pentasódico

PGA – poli-ácido glicólico

PLA – poli-ácido láctico

PCL – policaprolactona

PVA – poli-álcool vinílico

PEO- polioxido de etileno

DSC – Calorimetria diferencial de varredura

DTG – Termogravimetria derivativa

CAP – propionato acetato de celulose

FTIV – Espectroscopia de infravermelho com transformado de fourier

CAB – butirato acetato de celulose

CO₂ – Dióxido de carbono

NH₂ – Amina primária

ΔG_m – energia livre de mistura

ΔH_m – entalpia de mistura

ΔS_m – entropia de mistura

GA – Grau de Acetilação

MM – Massa Molar

N₂ – Nitrogênio

RMN – Ressonância magnética nuclear

T_c – Temperatura de cristalização

T_g – Temperatura de transição vítrea

TG – Termogravimetria

TGA – Análise termogravimétrica

HCl – Ácido Clorídrico

T_m – Temperatura de fusão

ΔT – Variação de temperatura

PAMAM – Poliamidoamina

NaOH – Hidróxido de Sódio

MeOH – Metanol

Da - Dalton

GPC – Cromatografia de permeação em gel

M_v – Massa molar viscosimétrica

RESUMO

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. O biodiesel surge como uma alternativa em relação ao petróleo e seus derivados, já que sua utilização pode garantir a segurança energética, a diminuição da poluição do ar, além de ser uma energia renovável.

Recentes pesquisas buscam produzir o biodiesel de forma sustentável e economicamente viável. Os estudos dão ênfase ao processo de biocatálise como forma de baixar os custos da produção de biodiesel.

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento do setor biotecnológico no Brasil, encontra-se o estudo de novos biocatalisadores com propriedades magnéticas utilizando diferentes polímeros de origem natural como suporte de enzimas a serem utilizados no processo de produção de bicomcombustíveis. Assim a quitosana, segundo polímero natural encontrado em maior quantidade na natureza, foi caracterizada e modificada fisicamente e quimicamente com o objetivo de avaliar seu potencial como suporte magnético da enzima Lipase a ser utilizada num reator assistido por campo magnético.

Foi modificada a quitosana pela adição do homopolímero polióxido de etileno (PEO) e os copolímeros PE-b-x%PEO contendo 50 e 80% do co-monômero PEO sem modificar e 80%PEO modificado parcialmente (PE-b-80%PEO-COOH). Ainda foi utilizado o trifosfato de sódio (TPF) para realizar a modificação química da quitosana.

Os filmes densos da quitosana, sem modificar e modificada, foram preparados pela técnica de *casting* e caracterizados utilizando as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia de força atômica (AFM), difração de raios X (DRX), espectroscopia de infravermelho (FITV), análise dinâmico mecânico (DMA), calorimetria diferencial exploratória (DSC) e determinada as propriedades de transporte destes materiais pelas técnicas gravimétrica e fotoacústica. Os resultados mais significativos indicaram a diminuição da cristalinidade da quitosana quando modificada com o PEO e seus copolímeros na

proporção 80/20 m/m, a formação de misturas homogêneas e diminuição do coeficiente de solubilidade (H) do vapor de água.

Os suportes a partir da quitosana e suas blends foram preparados utilizando as técnicas de *spray drying* e coagulação. As diferentes microcápsulas foram caracterizadas em termos de distribuição de tamanho, porosidade, morfologia e carga magnética.

As microcápsulas formuladas pela técnica de coagulação com a quitosana e a blenda Q/PEO (80/20 m/m) apresentaram a maior carga magnética (~50% m/m) de Fe_3O_4 e um comportamento magnético com uma reversibilidade elevada e não houve indução residual, sendo as microcápsulas de Q/PEO as que apresentaram a maior magnetização de saturação.

Os biocatalisadores foram formulados utilizando as metodologias de adsorção e de imobilização covalente da enzima Lipase K tanto no suporte de quitosana como da blenda Q/PEO.

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 e particularmente quando utilizado como suporte a blenda Q/PEO.

ABSTRACT

The growing concern over global warming at the beginning of the XXI century encourages discussions of new energy sources. Biodiesel is an alternative to petroleum based diesel and its derivatives its use can ensure less expensive energy and reducing air pollution, Moreover, biodiesel is a renewable type of energy.

Recent research works are seeking to produce biodiesel in a sustainable and economically viable manner. Studies emphasize the process of catalysis as a way to lower the cost of biodiesel production.

Among the prospects for development of the biotechnology sector in Brazil, the study of new biocatalysts with magnetic properties is a priority. In the case different polymers of natural origin as a support for enzymes are used in the production of biofuels. Thus chitosan, a natural polymer found as the second largest amount in nature, was characterized physically and chemically modified in order to evaluate its potential as a magnetic medium of the enzyme lipase to be used in a reactor assisted by magnetic field.

Chitosan was modified by the addition of polióxido ethylene homopolymer (PEO) and PE-b-x%PEO copolymers containing 50% PEO and 80% of co-monomer PEO and 80% partially modified PEO (PE-b-PEO-COOH 80%). It was also used the sodium triphosphate (TPF) to perform chemical modification of the chitosan.

The dense films of both pure and partially modified chitosan, were prepared by casting technique and characterized using the techniques of scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), X-ray diffraction (XRD), infrared spectroscopy (FTIR), dynamic mechanical analysis (DMA), and differential scanning calorimetry (DSC). The transport properties of these materials were determined by gravimetric and photoacoustic techniques. The most significant results indicated a decrease in crystallinity of the chitosan when modified with PEO and its copolymers in proportion 80/20 w / w. The formed mixtures were homogeneous and presented decreased solubility coefficient (H) of water vapor.

The supports from chitosan and its blends were prepared using both the spray drying and coagulation technique. The different microcapsules were characterized in terms of size distribution, porosity, morphology and magnetic charge.

The microcapsules made by the coagulation technique with chitosan blend and Q / PEO (80/20 w / w) showed the greatest magnetic charge (~ 50% w / w). It

also presented a Fe_3O_4 magnetic behavior with a high reversibility and no residual induction, The microcapsules Q / PEO were those that had the highest saturation magnetization.

The biocatalysts were formulated using the methods of adsorption and covalent immobilization of the enzyme Lipase K both in support of the blend of chitosan as Q / PEO.

The catalytic tests, carried out in a preliminary way using an emulsion of oil, water and gum Arabic, showed a higher catalytic activity for the covalently immobilized enzyme this was particularly the situation when used as support for blend Q / PEO.

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. Em todo o mundo já se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, que causariam um impacto muito menor no aquecimento do planeta (Gonçalves et. al., 2005). O biodiesel ganhou importância pela sua capacidade de substituir os combustíveis fósseis (Muthu, 2008).

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

Recentes pesquisas buscam produzir o biodiesel de forma sustentável e economicamente viável. Os estudos dão ênfase ao processo de biocatálise como forma de baixar os custos da produção de biodiesel.

O uso de enzimas como catalisadores da reação de transesterificação para produção de Biodiesel, tem se tornado uma opção bastante atrativa, devido a especificidade das enzimas e dos benefícios ambientais e econômicos decorrentes da utilização deste biocombustível.

O desenvolvimento de novas técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (Nascimento et. al., 2004).

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 (Nascimento et. al., 2004).

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (Nascimento et. al., 2004).

Polímeros naturais têm sido utilizados para imobilização de enzimas em vários estudos (Murat, 1995). Polissacarídeos representam o grupo mais utilizado entre eles, por contribuir para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalizador, criando um micro-ambiente favorável e mantendo dessa forma, a atividade enzimática (Nascimento et al., 2007).

A quitosana vêm sendo estuda e aplicada no processo de imobilização de enzimas, uma vez que possui características interessantes para sua utilização como: biocompatibilidade, baixa toxicidade e biodegradabilidade.

Microcápsulas de quitosana vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de melhorar suas propriedades de adsorção. A versatilidade deste polímero permite a preparação de microcápsulas de diferentes formas e tamanhos, envolvendo diversos produtos e derivados. O uso de quitosana porosa em partículas apresenta inúmeras vantagens no processo de imobilização de enzimas.

O presente trabalho tem como objetivo a formulação e caracterização de microcápsulas magnéticas de quitosana para atuarem como suporte em processos de produção de biodiesel.

Foram formuladas microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada e, estas foram caracterizadas utilizando diversas técnicas de análise, quantitativa, qualitativas e morfológicas.

1.1-OBJETIVOS:

1.1.1 - OBJETIVOS GERAIS

- ✓ Promover a modificação da quitosana procurando novas propriedades.
- ✓ Formulação e caracterização de filmes densos a partir de quitosana modificada com potencial uso biotecnológico.
- ✓ Formulação e caracterização de microcápsulas com núcleo magnético para uso na área biotecnológica.

1.1.2-OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ✓ Formular e caracterizar blendas das quitosanas procurando modificar cristalinidade e hidrofiliidade preservando a funcionalidade NH.
- ✓ Formular e caracterizar microcápsulas contendo como núcleo nanomagnetita e uma superfície irregular que propicie a imobilização de enzimas e células para a produção de biodiesel.

1.2-JUSTIFICATIVAS:

O desenvolvimento de novos materiais que possuam propriedades específicas e que por sua vez contribuam ao desenvolvimento sustentável é o foco principal na atualidade de cientistas e ambientalistas.

Assim a utilização de polímeros naturais como a quitina e seu derivado a quitosana obtido a partir da desacetilação, vem sendo objeto de estudo, para sua aplicação em diversas áreas. Embora possa ser sintetizada é considerado um polímero natural, tendo em vista que sua principal fonte de obtenção é a quitina, que por sua vez é um dos polissacarídeos naturais mas abundantes na natureza, perdendo apenas para a celulose.

A utilização da quitosana para o desenvolvimento de novos materiais se torna atrativa no sentido de que a quitosana pode ser obtida a partir de recursos renováveis, como a partir da carapaça de crustáceos de onde se obtém a quitina que depois de processada se transforma em quitosana.

A produção de quitina tem aumentado de forma considerável no Brasil, isto viabiliza seu uso

Além desta vantagem a quitosana apresenta baixa toxicidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade entre outras propriedades que permitem sua utilização na área biotecnológica.

Por outro lado existe uma crescente preocupação com a necessidade de um desenvolvimento sustentável o que tem sido um incentivo adicional a pesquisa científica, principalmente no Brasil, no sentido de utilizar combustíveis renováveis, como o biodiesel, sendo uma alternativa para substituição de combustível fósseis e preservação do meio ambiente.

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

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – POLÍMEROS BIODEGRADÁVEIS

Os polímeros biodegradáveis são classificados em duas categorias, baseada na fonte de obtenção; ou seja, rotas sintéticas ou naturais, incluindo plantas e microrganismos.

A primeira consiste de polímeros sintéticos obtidos em laboratório, onde grupos susceptíveis ao ataque enzimático são previamente programados para fazer parte de sua estrutura, como no caso dos poliésteres alifáticos. Estes são facilmente biodegradados e vários exemplos já são conhecidos e utilizados, tais como o poli-ácido glicólico (PGA), o poli-ácido láctico (PLA), copolímeros do PLA/PGA e a policaprolactona (PCL).

Outros polímeros sintéticos também conhecidos como susceptíveis à biodegradação são o poli-álcool vinílico (PVA) e o poli-óxido de etileno (PEO) (Verhoogt, 1994).

A segunda rota de obtenção de polímeros biodegradáveis é a natural, onde estão contidos alguns microrganismos e plantas. Dentre as plantas podemos citar a celulose e o amido que existem em grande abundância na Terra e são bem conhecidos pelo homem. Entretanto, outras fontes naturais, como os microrganismos, têm se revelado promissoras.

A biodegradação de polímeros ocorre geralmente por hidrólise e oxidação. Vários fatores como a presença na cadeia principal de determinados grupos funcionais, ligações hidrolisáveis e/ou oxidáveis, natureza dos substituintes, estereo configuração, grau de hidrofobicidade ou hidrofiliicidade, e flexibilidades conformacional influenciam a biodegradabilidade dos polímeros (Huang e col., 1995).

É importante chamar a atenção sobre o processamento de polímeros naturais, tais como celulose e amido. Como a celulose possui uma alta somatória de energia de interação, por pontes de hidrogênio entre as cadeias, ela não dissolve em solventes comuns e degrada antes de sofrer a fusão como outros termoplásticos convencionais. Assim, ela deve passar por modificação estrutural, como a introdução de grupos laterais na cadeia, de modo a diminuir esta alta energia de interação e ser

processada. Exemplos disso são os ésteres de celulose, que podem ser processados como um polímero termoplástico, uma vez que a temperatura de fusão foi reduzida significativamente abaixo do ponto de degradação devido a introdução dos grupos ésteres na cadeia. Semelhante à celulose, o amido deve ser modificado antes de ser processado, porém deve-se ter cuidado para que sua modificação não coloque em risco seu grau de biodegradação (Maddever,1990).

2.2 - QUITOSANA

A quitosana é obtida da quitina que é um polissacarídeo natural muito importante. Considerando a quantidade de quitina produzida anualmente no mundo, é o maior polímero em abundância após a celulose. A quitina é sintetizada por um número enorme de organismos vivos e é encontrada principalmente, no exoesqueleto de crustáceos como camarão, caranguejo e lagosta.

O derivado mais importante da quitina é a quitosana, obtida pela desacetilação da quitina. A quitosana é um produto natural não-tóxico e, devido à presença dos grupos $-NH_2$ e $-OH$ na estrutura do polímero, possui características que lhe conferem uma ampla aplicação.

Atualmente a quitosana vem sendo utilizada no tratamento de águas, produção de cosméticos, drogas e medicamentos, aditivos alimentícios, membranas semi permeáveis e no desenvolvimento de biomateriais. Na presença de soluções diluídas de ácidos, a quitosana comporta-se como um polieletrólito catiônico, constituído de um copolímero de 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose e 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose de composição variável em função do grau médio de acetilação, GA , que representa a fração de unidades e é um dos principais parâmetros para sua caracterização.

As estruturas da celulose, da quitina e da quitosana são mostrada na Figura1.

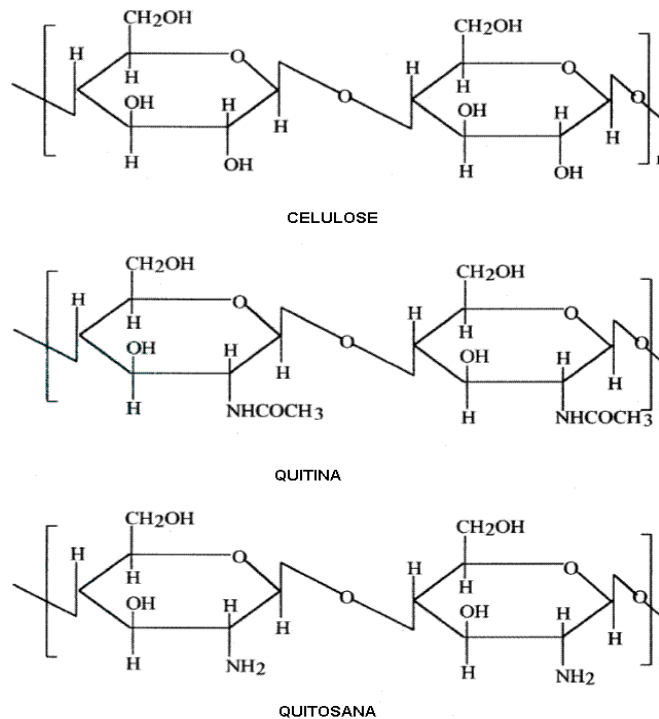


Figura 1 – Estrutura dos polímeros: celulose, quitina e quitosana.

Atualmente os polímeros naturais tais como a celulose, quitina e quitosana e seus derivados possuem maior degradabilidade e biocompatibilidade, quando comparados com a maioria dos polímeros sintéticos encontrados nos dias de hoje.

Entretanto, estes materiais naturalmente abundantes exibem limitações em relação à reatividade e processabilidade. A quitina e a quitosana são indicadas como materiais funcionais apropriados, por possuírem propriedades excelentes, tais como, biocompatibilidade, biodegradabilidade, não-toxicidade e propriedades de adsorção, entre outras.

Recentemente, muita atenção foi dada a quitosana com um polissacarídeo em potencial. No entanto, embora tenha sido feito grandes esforços com a finalidade de preparar derivados funcionais da quitosana, através de modificações químicas, poucos foram os sucessos alcançados, com relação a solubilidade em solventes orgânicos em geral e em alguns sistemas de solvente binários. A quitina e a quitosana quimicamente modificadas têm como resultado uma melhora na solubilidade com relação a solventes orgânicos em geral.

2.3 - FONTES DE QUITINA E QUITOSANA

Quitina e quitosana são biossintetizados e biodegradados na biosfera terrestre. Com estimativa anual de 100 bilhões de toneladas por ano, bem distribuídos na natureza sem haver um excesso de acúmulo.

A quitina é um dos materiais orgânico mais abundante na natureza, perdendo apenas para a celulose. Por outro lado, a quitosana não é muito encontrada como material natural em si, quando comparada à quitina e à celulose, ocorrendo muito dispersamente em alguns microorganismos. Por isso, devido à baixa ocorrência natural, a quitosana é normalmente obtida por desacetilação da quitina natural. Contudo, a quitosana assim obtida ainda é considerada como um biopolímero natural.

A quitina é amplamente distribuída na natureza, sendo maior componente estrutural do exoesqueleto dos invertebrados marinhos, cuja quantidade relativa varia de 30 a 60% nos crustáceos (cuja a quantidade relativa varia de 30 a 60%) nos crustáceos) e da cutícula dos insetos, como também é encontrada na parede celular de alguns fungos e leveduras.

A quitina funciona como um componente fibroso na estrutura do exoesqueleto, cutícula e parede celular dos organismos nos quais ocorre. Desta maneira, ela é quase sempre encontrada associada às proteínas, formando oligoproteínas que funcionam como matrizes que interagem com outros constituintes, como os taninos fenólicos na cutícula dos insetos e os minerais no exoesqueleto dos crustáceos.

Embora esteja bastante difundida na natureza, no momento a fonte economicamente mais viável para a obtenção da quitina, e conseqüentemente da quitosana, tem sido os refugos industriais do processamento de crustáceos, destacando-se entre eles, já em larga escala, os caranguejos, camarões e lagostas.

Devido ao aumento acelerado o interesse científico principalmente industrial em quitina e quitosana, outras fontes destes materiais foram avaliadas como, por exemplo, extração de quitina do fungo utilizado na produção do ácido cítrico. (referencia). Os investigadores acreditam que nos futuros os microorganismos serão uma das principais fontes de quitina e quitosana.

Entretanto, estas e outras novas fontes testadas ainda não têm demonstrado viabilidade econômica, devido ao alto custo, além de problemas técnicos e científicos, encarecendo o produto final. Contudo, as fontes naturais no momento são basicamente os resíduos de crustáceos, que ainda mostram suficiência no suprimento da demanda mundial.

Entretanto, para evitar problemas futuros, até mesmo de ordem bioecológica, cada vez mais crescem as investigações em busca de novas fontes e tecnologias adequadas para obtenção de quitina e de quitosana.

2.4- ASPECTOS FÍSICOS E QUÍMICOS DA QUITINA E QUITOSANA

A quitina é um biopolímero de cadeia linear formado por unidades de N-acetil-2-amino-dioxi-D-glicopiranosose, unidades interligadas por ligações glicosídicas (1 → 4) glucosamina, formando um polissacarídeo cristalino representado pela fórmula geral $[C_8H_{13}O_5N]_n$. Normalmente é denominado poli[β (1→4)-N-acetil-D-glucosamina] ou N-acetilglucosamina. (referencia) Sua massa molecular é estimada de 1 a 2×10^6 Dalton.

A estrutura química da quitina é muito semelhante à da celulose. A principal diferença entre elas se encontra no tipo de grupamento situado na posição axial no carbono 2 do anel de piranosose. No carbono da celulose encontra-se uma hidroxila, enquanto na quitina tem-se um grupamento mais volumoso que é uma acetamida (-NHCOCH₃), esta diferença pode ser melhor visualizada na figura abaixo

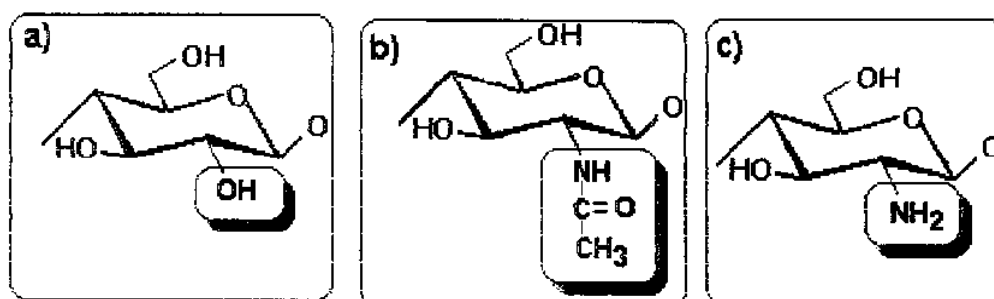


Figura 2 - Principal diferença entre as estruturas de celulose, quitina e quitosana.

A quitina é conhecida em três formas estruturais diferentes, α -, β e γ , mostradas na Figura 3. Destas as α -, β - quitinas, são as mais conhecidas, sendo a

α -quitina a mais comum e por isso também é a mais estudada. A estrutura da γ -quitina é muito pouco conhecida devido à rara ocorrência e formação natural.

A quitina é biodegradável, não-tóxica, insolúvel em água e em muitos solventes orgânicos. É despolimerizada na presença de ácidos minerais fortes, sendo parcialmente solúvel em solução de dimetilacetamida com 5% cloreto de lítio

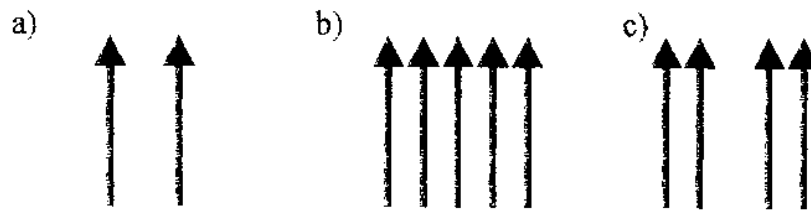


Figura 3 - Representação do arranjo das cadeias poliméricas das quitinas conhecidas: a) α b) β e c) γ

A quitina poli[β (1 \rightarrow 4)-2-amino-2-dioxi-D-glicopirranose] é um biopolímero obtido normalmente pela desacetilação química da quitina, sendo representada pela fórmula geral $[C_8H_{11}O_4N]_n$. É normalmente denominada de poli[β (1 \rightarrow 4)-N-cetil-D-glucosamina] ou N-glucosamina, portanto, assemelha-se quimicamente ao biopolímero original quitina.

A quitosana possui no carbono 2 uma amina primária ($-NH_2$), como mostra a Figura 1. Esta diferença faz com que a quitosana tenha certas características químicas e físicas diferentes da quitina e da celulose, que na maioria dos casos são consideradas bem mais interessantes como, por exemplo, o fato de ser um polieletrólito, possuir melhor solubilidade, reatividade, etc. (Hirano, 1996).

A quitosana é solúvel em muitos ácidos orgânicos e em soluções ácidas cujo pH seja acima de 6,5.

O grupo amina presente na quitosana possui um pKa em torno de 6,2 a 7,0 o que torna um polieletrólito quando dissolvida em meios cujo pH seja mais baixo. (Azevedo, 2004).

A quitina e a quitosana são uns dos poucos polieletrólitos catiônicos naturais. Diferente dos outros polissacarídeos naturais, que se apresentam neutros ou negativamente carregados. A quitosana dispõe de grupos aminos que reagem com certa facilidade, o que permite a obtenção de muitos compostos derivados.

A quitina, a quitosana e seus derivados são considerados polímeros heterogêneos, porque possuem na cadeia polimérica tanto monômeros acetilados quanto desacetilados, conforme mostra a Figura 4, isto porque, as formas totalmente acetiladas ou desacetiladas, respectivamente, não ocorrem normalmente na natureza e são de difícil preparação e laboratório. (Muzzarelli, 1997).

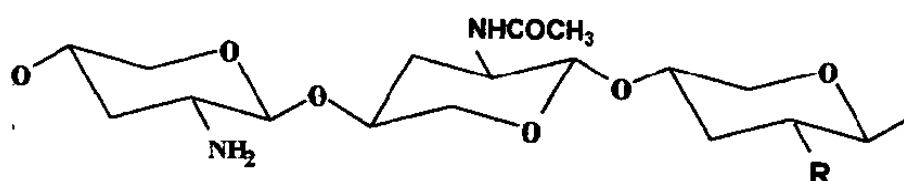


Figura 4 - Representação da heterogeneidade da cadeia polimérica dos polímeros: quitina (NHCOCH₃), quitosana (NH₂) e forma modificada (R).

A análise elementar da quitina mostra a presença de moléculas de água incorporadas ao polímero. (Muzzarelli, 1997). Alguns pesquisadores estimam que a quitina é constituída de 82,5% de unidades acetiladas, 12,5% de unidades desacetiladas e 5% de água.

De um modo prático, a quitina e a quitosana podem ser distintos pelo critério de solubilidade em solução aquosa de ácido diluído. Quando o polímero possui alto teor de grupos N-acetil ($\geq 40\%$) distribuídos na cadeia polimérica, ele é normalmente insolúvel, sendo denominado de quitina. Quando os mesmos grupos são menores que 40%, este polissacarídeo passa a ser solúvel em solução aquosa de ácido diluído, é então denominado de quitosana. (Peter, 1995).

A dissolução da quitosana em solução aquosa de ácido diluído não se deve apenas ao rompimento das ligações intermoleculares envolvendo os grupos N-acetil presentes na quitina, mas também, às propriedades hidrofílicas das unidades de glucosamina (Glc – NH₂), que em pH abaixo de 6 são protonadas levando a um equilíbrio, conforme mostra a equação (1).



A solubilidade de quitosana em solução aquosa de ácido diluído está relacionada principalmente com o grau de N-acetilação (GA) ou N-desacetilação (GD) deste biopolímero.

Portanto, a solubilidade da quitosana pode ser associada à vários fatores: quantidade de grupos N-acetil (NCOCH_3) e de grupos amina (NH_2), distribuição destes grupos na extensão da cadeia polimérica, pH e força iônica da solução.

2.5 – APLICAÇÕES GERAIS DA QUITOSANA

Atualmente a utilização da quitina e de seus derivados em escala industrial ainda é muito menos importante que o uso da celulose, mas alguns importantes seguimentos do mercado empregam derivados da quitina. Dentre estes derivados destaca-se a quitosana.

A grande potencialidade de aplicação em diversas áreas (biomédica, alimentícia, agricultura, tratamento de água, cosméticos e fármacos) juntamente com seu baixo custo e suas propriedades – como biodegradabilidade e baixa toxicidade – têm intensificado as pesquisas com a utilização da quitosana e a sua modificação química.

Dessa forma, o número de publicações relacionadas à quitina e quitosana teve um acréscimo exponencial de aproximadamente 480 artigos no início dos anos 1970 para 9500 artigos no período 2000-2008.

Muitas das pesquisas de aplicação da quitosana encontram-se na área de catálise mostrando suas vantagens na catálise heterogênea como suporte em que a principal vantagem é a recuperação do catalisador ao final da reação, sobretudo quando este agrega um alto valor.

As primeiras referências da quitosana como suporte catalítico foram citadas no início dos anos 80 para a preparação de catalisadores na hidrogenação. Recentemente, catalisadores de quitosana modificada têm sido preparados para diferentes reações como: reação de oxidação, ciclopropanação de olefeínas, reação de carbonilação, entre outras. Verifica-se também referências de catalise heterogênea com o uso direto da quitosana como catalisado pela sua funcionalidade natural, como na síntese de monoglicerídeo.

As modificações na estrutura da quitosana para formar derivados com características adequadas e propriedades ampliadas geralmente envolvem os grupos – NH_2 e – OH presentes nas cadeias dos polímeros.

Alguns exemplos de derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação estão exemplificados na Figura 5. Dentre os derivados da quitosana destacam-se os sais de quitosana que carregam cargas positivas permanentes nas cadeias do polímero devido à quartenização dos átomos de nitrogênio do grupo amina. Devido as características ácidas destes sais também pode ser investigado seu uso na catálise.

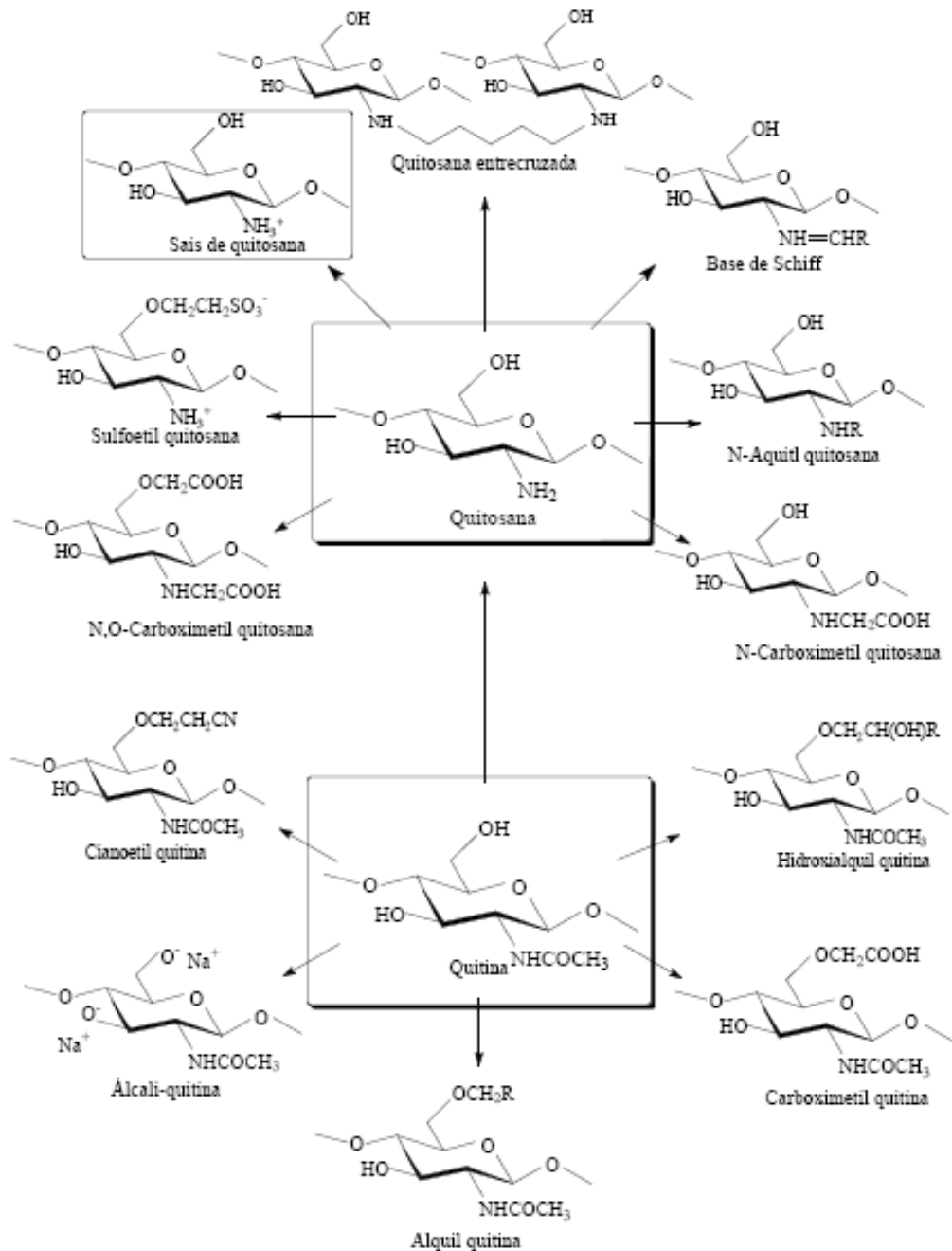


Figura 5 - Derivados de quitosana e quitina que apresentam grande potencialidade de aplicação.

2.6 – MISTURAS POLIMÉRICAS

A pesquisa para obtenção de novos materiais, através de modificações de polímeros já conhecidos ou da mistura de polímeros, tem mostrado novas direções para a produção de materiais economicamente viáveis e com propriedades desejáveis. (Cypriano, 2005)

O fenômeno de misturar materiais é conhecido desde idades pré-históricas, quando ligas de novos metais deram origem a outros materiais como o bronze. Desta forma, dois ou mais polímeros podem ser misturados para resultar produtos com propriedades desejáveis, porém a idealidade raramente é atingida devido a alguns problemas inerentes e fundamentais.

Grande parte dos pares de polímeros que entram na mistura, não é termodinamicamente miscível e, assim, existem duas fases distintas na mistura final. A não miscibilidade resulta em uma interface que pode conduzir a um baixo desempenho do sistema resultante. Por exemplo, uma alta tensão interfacial e pobre adesão entre as duas fases numa mistura, podem levar à redução do grau de dispersão e a separação total durante o processamento ou o uso.

Essa baixa adesão também é responsável por propriedades mecânicas fracas devido à pobre transferência de energia entre as fases, além de impedir a formação de estruturas definidas morfologicamente (Camargo, 2003).

Sistemas poliméricos com dois ou mais componentes são divididos em:

- a) mistura de polímeros (Blendas),
- b) copolímeros
- c) compósitos.

Este trabalho se dedicou à mistura de polímeros ambientalmente degradáveis (EcoBlendas), sistemas em que os polímeros são misturados mecanicamente, sem interações químicas efetivas, como ocorre com copolímeros. Porém, uma melhor dispersão pode ser esperada em copolímeros (em bloco) do que num sistema de mistura que tem os mesmos pares do polímero. Mesmo assim, foi observado que quase todos os copolímeros exibem também algum grau de separação de fase (Camargo, 2003).

2.7 - COMPATIBILIDADE

Compatibilidade é comumente usada para descrever uma mistura completa em nível molecular. Porém, quando temos macromoléculas ou polímeros, as dimensões moleculares são bem maiores e o termo “compatibilidade” deve ser usado com cautela. Por definição, muitos sistemas poliméricos heterogêneos podem ser definidos como compatíveis, embora eles mostrem um certo grau de separação de fases e transições vítreas bem distintas (T_g).

A compatibilidade, ou homogeneidade de uma mistura de polímeros, pode somente ser definida em função das dimensões moleculares da separação de fases, que geralmente podem ser caracterizadas por diferentes técnicas de medida como, Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC), Análise Mecânico Dinâmico (DMA), Análise Termogravimétrica (TGA), Ressonância Magnética Nuclear (RMN), dentre outras. Conseqüentemente, compatibilidade é tratada como um termo relativo e pode ser definida por um número de compatibilidade, denominado N_c , definido por (Camargo, 2003):

$$N_c = \frac{\text{Tamanho da sonda experimental}}{\text{Tamanho do domínio de Fases}} \quad (2)$$

O tamanho da sonda experimental pode ser a escala de resolução de um instrumento técnico. O tamanho do domínio é a dimensão dispersa na fase de uma blenda.

Assim:

- i) quando $N_c \rightarrow \infty$ (sistema é compatível)
- ii) quando $N_c \rightarrow 1$ (sistema é semi compatível)
- iii) quando $N_c \rightarrow 0$ (sistema é incompatível)

Na Figura 6, tem-se uma representação esquemática de um sistema de duas fases, que ilustra a definição de um sistema compatível, incompatível e semi compatível usando DMA.

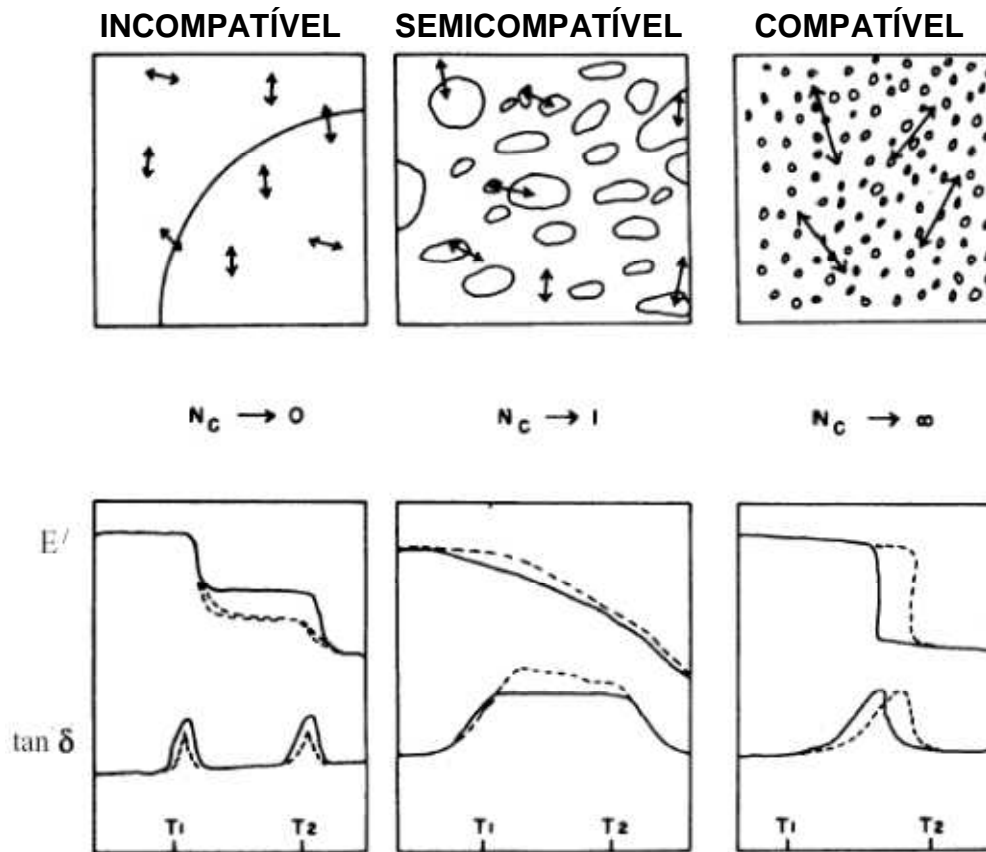


Figura 6 – Representação de um sistema de duas fases por DMA.

Quando N_c chega a zero, a dimensão de cada fase existente, num sistema bifásico, é muito maior que o tamanho da sonda do instrumento e, assim, este pode detectar duas transições que correspondem a cada fase. Em outras palavras, duas Tg's distintas serão observadas.

Para o caso compatível (N_c chega a ∞), o tamanho de sonda é muito maior que as dimensões de fase e, assim, o instrumento não pode detectar flutuações pequenas na composição. Com isso, apenas uma única Tg média, correspondendo aos dois componentes, será medida.

Para o caso semi compatível, um grande efeito é observado e a curva de $\tan \delta$ tem uma larga faixa de temperaturas, desde a mais baixa até a mais alta, correspondentes às transições associadas a cada componente. Assim, o registro de

uma única ou de duas transições, no DMA, dá uma indicação das dimensões moleculares ou número das fases presentes no sistema.

A dimensão (domínio) que corresponde na análise dinâmico-mecânica (DMA) é aproximadamente 15 nm. A técnica de RMN pode detectar outras flutuações na composição ou na variação dimensional que chega a 2,5-5 nm.

2.8 – MISCIBILIDADE

Na literatura tecnológica o termo “miscibilidade” é usado para definir a interação entre pares de polímeros, em nível molecular. Portanto, miscibilidade não é sinônimo de compatibilidade. Compatibilidade é usada para caracterizar a facilidade relativa de obtenção ou o desempenho dos polímeros em uma mistura.

Os componentes da blenda podem ter uma segregação de fases, podem não ser miscíveis sobre o ponto de vista termodinâmico, mas se houver propriedades desejáveis na blenda ela é considerada compatível (Camargo, 2003).

Um aspecto determinante das propriedades das blendas é a miscibilidade. As blendas são definidas em duas classes distintas: *blendas miscíveis*, quando apresentam homogeneidade em escala molecular, associada a valores negativos de energia livre de mistura, ΔG_m , e *blendas imiscíveis*, quando o material apresenta duas ou mais fases apresentando valores positivos de ΔG_m (Ultracki, 1998).

Uma outra classificação é a baseada na transição vítrea das blendas e tempos de relaxações. Considera que além dos casos descritos anteriormente, a situação onde existem estruturas com duas ou mais fases, sendo cada uma delas constituída de uma mistura miscível com concentração distinta e finita de cada componente. Este tipo de mistura é classificado como parcialmente miscível (Camargo, 2003).

É um quarto tipo de estrutura multifásica, em que se observa somente uma transição vítrea, porém, ocorrendo em uma faixa de temperatura mais ampla que aquelas observadas em sistemas de uma única fase. Este comportamento é atribuído à presença de microheterogeneidades, ou seja, à presença de diferentes microambientes com dimensões da ordem de poucos segmentos de cadeia.

As propriedades das blendas são diretamente afetadas pela miscibilidade. A mistura entre macromoléculas resulta em baixa variação de entropia, por isso, para que haja miscibilidade, o fator entálpico deve ser favorecido, ou seja, é necessária a existência de interações específicas tais como: ligações de hidrogênio, interações entre íon-dipolo, dipolo-dipolo ou elétrons π .

Entretanto, estas interações ocorrem em apenas alguns sistemas, de maneira que a maior parte destas blendas é imiscível (Utracki, 1990).

Os tipos de morfologia que geralmente são encontradas em blendas imiscíveis são: (a) dispersão de um polímero em uma matriz polimérica e (b) morfologia de duas fases contínuas.

O tipo de morfologia que será favorecido depende da natureza dos componentes da blenda, e muitas vezes da forma de obtenção. Em misturas mecânicas, a razão de viscosidade dos polímeros na temperatura de processamento e da composição da blenda, assim como cisalhamento e fluxo determinam a morfologia da mistura (Utracki, 1990).

As blendas imiscíveis apresentam uma alta tensão interfacial que, juntamente com a alta viscosidade dos polímeros, dificulta a dispersão de uma fase na outra durante o processo da mistura, favorecendo a coalescência. A baixa estabilidade deste sistema também permite que a coalescência se acentue ao submeter o material a algum processo posterior, como a moldagem, ou mesmo com o tempo de uso.

Outra característica de blendas imiscíveis é a baixa adesão entre as fases. Quando um material é submetido a um esforço mecânico, a transferência de tensão de uma fase para outra ocorre na interface. Se a interação entre as fases for baixa, nesta região ocorrerá um acúmulo de tensões quando o material for solicitado mecanicamente, o que acabará originando uma fratura (Camargo, 2003).

Entretanto, as blendas imiscíveis podem adquirir boas propriedades mecânicas se a interface for modificada pela ação de agentes que sejam capazes de reduzir a tensão interfacial, promoverem a dispersão, aumentar a adesão interfacial e estabilizar a fase dispersa contra a coalescência.

Estes agentes, chamados de compatibilizantes, podem ser adicionados como um terceiro componente ou gerados *in situ*. As blendas que adquirem as propriedades desejadas e resistem à coalescência após a mistura são chamadas de

compatíveis, o que não significa que sejam miscíveis do ponto de vista termodinâmico (Camargo, 2003).

2.8.1 - TERMODINÂMICA E MISCIBILIDADE

A miscibilidade é um fator relevante na preparação de blendas e há uma dependência relevante das variáveis como, temperatura, pressão, massa molar, estrutura molecular, dentre outras. Ela pode ser avaliada, para uma mistura qualquer, pela energia livre molar de mistura de Gibbs (ΔG_m), que está relacionada com a entalpia de mistura (ΔH_m) e com a entropia de mistura (ΔS_m) do sistema (equação 3):

$$\Delta G_M = \Delta H_M - T\Delta S_M \quad (3)$$

Uma definição simplificada de blendas poliméricas, adotada no dia-a-dia, compreende uma mistura de pelo menos dois polímeros, ou copolímeros. Entretanto, quando o fator miscibilidade é importante, define-se:

- a) Blendas poliméricas miscíveis: misturas homogêneas de polímeros, onde a variação de entalpia < 0 favorece a miscibilidade e contribui para uma significativa diminuição da energia livre de Gibbs para a mistura (equação 4):

$$\Delta G_M \cong \Delta H_M \leq 0 \quad (4)$$

O poli (óxido fenileno) e o poliestireno exemplificam este tipo de blenda.

- b) Blendas poliméricas imiscíveis: neste caso a variação de entalpia > 0 não favorece a mistura (equação 5):

$$\Delta G_M \cong \Delta H_M \geq 0 \quad (5)$$

Como exemplo de blenda imiscível temos o acetato de celulose e poliestireno.

2.8.2 - BLENDA POLIMÉRICAS

2.8.2.1 - ASPECTOS GERAIS

O estudo e a obtenção de blendas poliméricas é uma saída para a modificação das propriedades de materiais poliméricos. As blendas de polímeros miscíveis são materiais que podem apresentar propriedades mecânicas melhores que as de cada um dos polímeros componentes isolados.

Entretanto, as blendas com muito baixa miscibilidade apresentam separação de fases, e neste caso, as suas propriedades vão depender das propriedades de cada fase. A primeira blenda patenteada de que se tem conhecimento foi a blenda de borracha natural misturada com guta-percha em 1846.

As blendas obtidas de termoplásticos sintéticos que iniciaram a busca de novos materiais pode ter iniciado com a mistura do poli-cloreto de vinila (PVC), que já era conhecido desde 1872, mas a descoberta da sua plastificação com a borracha estireno butadieno (SBR ou Buna-S) na Inglaterra e Government Rubber-S (GBR) nos USA, foi patenteada em 1933. (Nunes, 1996)

E com a descoberta de um polímero plastificante semi-solúvel, o NBR, tornou-se possível a formulação de uma blenda estável e o efeito do baixo peso molecular do GRS no PVC, criando assim a primeira blenda de um polímero termoplástico e patenteada em 1942, iniciando-se assim uma geração e desenvolvimento de blendas com melhores propriedades de impacto. (Nunes, 1996)

No início da década de 60, os polímeros de engenharia foram explorados como resinas básicas para o desenvolvimento de blendas; estes novos materiais oferecem uma melhoria na resistência mecânica a altas temperaturas, em comparação com as primeiras blendas. (Nunes, 1996)

2.8.2.2 - MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE BLENDA POLIMÉRICAS

Segundo Utracki (1989), há uma variedade de técnicas experimentais que podem ser utilizadas para a preparação e caracterização de blendas poliméricas. As técnicas mais usadas na preparação de blendas, são as indicadas abaixo. Sendo que os itens a e b são os mais usados:

- a) Dissolução dos polímeros em um solvente apropriado, formando filmes por evaporação do solvente (*Casting*);
- b) Mistura mecânica através da fusão dos polímeros e posterior prensagem.
- c) Polimerização interfacial
- d) Mistura de látex
- e) Outros

A) BLENDA EM SOLUÇÃO:

O método de formação de filmes de blendas, por evaporação do solvente (“*casting*”) pode levar à obtenção de filmes densos ou ainda porosos.

Quando uma solução polimérica é espalhada sobre uma superfície plana, e é permitida a evaporação total do solvente, um filme denso e homogêneo se forma. Se a mesma camada de solução é introduzida em um banho de não solvente, um filme poroso é obtido. Este tipo de preparação de filme é denominado “inversão de fases”.

Algumas variações da técnica de inversão de fases são utilizadas na prática. Variações na composição da solução polimérica e do banho de imersão, bem como alterações de temperatura podem levar à formação de filmes com morfologias diferenciadas. Esta versatilidade faz do método de inversão de fases um dos mais utilizados na preparação de membranas porosas (Stropnik e col., 1996 e Ullman’sb, 1986).

Os primeiros polímeros utilizados na fabricação de filmes porosos na forma de membrana foram a celuloses e seus derivados (Camargo, 2003), pela sua

disponibilidade e conhecida capacidade de formar filmes. Atualmente é possível preparar filmes porosos a partir de muitos polímeros, como por exemplo, siliconas, polissulfatos, poliimidadas, dentre outros (Camargo, 2003).

B) MISTURA MECÂNICA:

Esta técnica consiste na mistura de polímeros através da fusão dos mesmos. O principal método de produção destas blendas utiliza extrusoras e misturadores do tipo *Banbury*.

A tecnologia envolvida aqui se baseia na termodinâmica e nas condições reológicas do sistema durante o processo de fusão e mistura. Além disso, a morfologia da blenda, a qual dependerá principalmente do grau de mistura e da taxa de resfriamento, é de extrema importância, pois apresenta influência direta nas propriedades finais do material obtido.

Um exemplo de blenda muito conhecido é: de poliestireno/polietileno de baixa densidade.

C) MISTURA REATIVA:

Este tipo de mistura é conhecido como extrusão reativa, e envolve a introdução de grupos reativos em um polímero, com o intuito de aumentar a miscibilidade dos componentes. As reações químicas mais comumente usadas são aquelas que ocorrem entre ácidos carboxílicos ou anidridos com aminas e grupos epóxi, ou ainda entre aminas e grupos epóxi.

Um exemplo de aplicação desta técnica é encontrado na manufatura de blendas imiscíveis de poli (éter fenileno) e poliamida, com adição de anidrido maleico (Camargo, 2003).

D) MISTURA DE LÁTEX:

Consiste na mistura de dispersões aquosas de dois polímeros ou mais. Em termos de morfologia, o tamanho dos domínios é restrito ao tamanho das partículas de látex.

Um exemplo é a reação entre SAN (estireno-acrilonitrila) e AB (butadieno-acrilonitrila) na formação do copolímero ABS (estireno-butadieno-acrilonitrila).

E) POLIMERIZAÇÃO *IN SITU*:

A polimerização *in situ* envolve soluções ou géis de polímeros em monômeros os quais são subseqüentemente polimerizados. A polimerização *in situ* de estireno, que permite a formação de poliestireno de alto impacto (HIPS), é considerada a mais importante em termos industriais. As redes interpenetrantes (IPN's) também são resultados da polimerização *in situ*. O princípio da formação das IPN's é baseado na combinação de dois polímeros, onde um deles é sintetizado ou reticulado na presença do outro (Camargo, 2003).

2.8.3 - MORFOLOGIA DE BLENDA POLIMÉRICAS:

O grau e o tipo de interação entre dois polímeros são os principais fatores que determinam a morfologia resultante numa blenda. A morfologia de sistemas binários, completamente imiscíveis, pode resultar em um sistema de duas fases, onde uma delas estará dispersa na outra, denominada matriz. Outra possibilidade morfológica consiste em uma rede co-contínua e interpenetrante formada por ambos polímeros.

A influência da temperatura no comportamento termodinâmico da blenda polimérica também é importante, pois ela determina o comportamento de separação de fases e a morfologia. Uma blenda homogênea, quando resfriada ou aquecida, pode ser analisada através de uma curva binodal, onde, ocorre uma separação de

fases de acordo com dois mecanismos distintos: nucleação e crescimento (*nucleation and growth* – NG) ou decomposição *spinodal* (*spinodal decomposition* SD). Tais mecanismos dependem da temperatura final e da localização desta entre as curvas binodal e *spinodal* ou inteiramente dentro da curva *spinodal* (Nunes e Inoue, 1996).

Uma solução inicialmente estável, quando levada a uma condição metaestável, entre as curvas binodal e *spinodal* sofre uma separação de fases pelo mecanismo de nucleação e crescimento (NG). Para iniciar a separação de fases é necessário uma energia de ativação para a formação de pequenos domínios (núcleos). A partir desta etapa, a separação de fase continua com o aumento do diâmetro dos núcleos sem que a sua composição seja alterada.

Neste caso, durante todo o processo de separação a morfologia observada é do tipo matriz domínios dispersos. Nas Figuras 7- 8 são representados os diagramas de fase para um sistema binário e ternário.

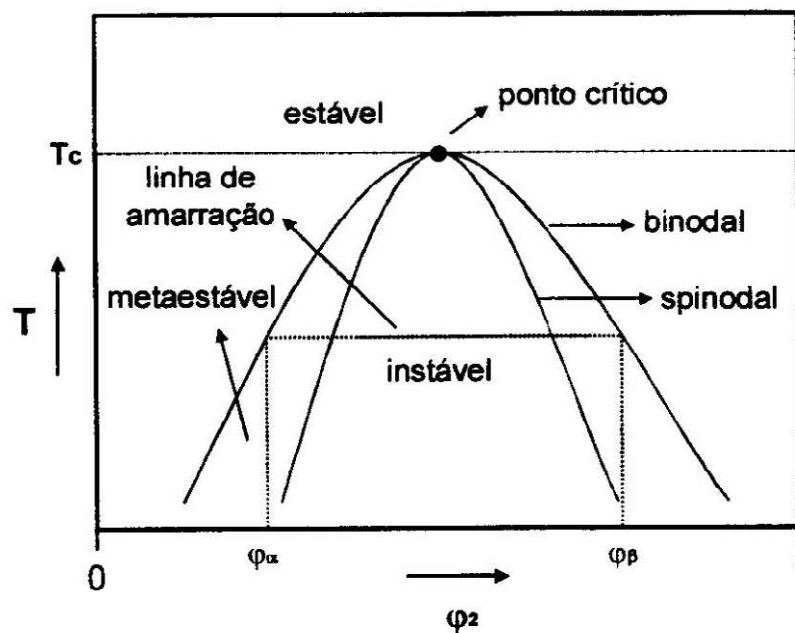


Figura 7 - Diagrama de fases para um sistema binário.

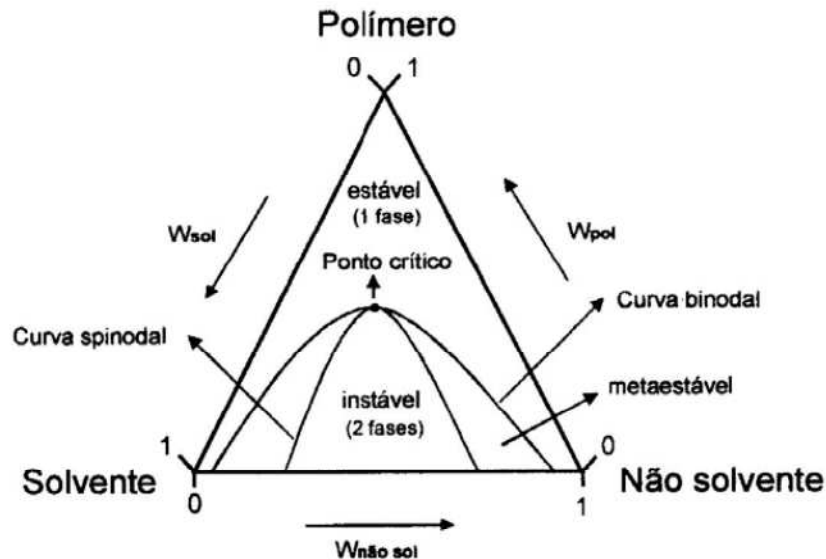


Figura 8 - Diagrama de fases para um sistema ternário demonstrando as curvas binodal e spinodal e o ponto crítico.

Quando a solução da blenda, inicialmente estável é conduzida rapidamente para uma condição instável (abaixo da curva *spinodal*), ocorre a separação de fases pelo mecanismo de decomposição *spinodal* (SD).

Este mecanismo difere daquele de nucleação e crescimento apenas nos primeiros estágios. No mecanismo de NG, a composição dos domínios é constante e somente o tamanho dos núcleos muda com o tempo. Já no mecanismo de SD observam-se três estágios de separação.

Ao analisarmos a solução, no início ocorrem flutuações na amplitude do comprimento de onda com o aumento da concentração. Em um estágio intermediário, tanto a amplitude do comprimento de onda como a concentração vai aumentando com o tempo; a partir deste ponto pode ocorrer a coalescência das fases.

A morfologia observada para o sistema no estágio inicial é de duas fases contínuas e entrelaçadas. Num estágio mais avançado, a morfologia pode evoluir, por coalescência, para o tipo matriz domínios dispersos (Camargo, 2003).

A morfologia obtida para polímeros após um processo de fusão, que pode ser realizada em extrusora ou em misturadores do tipo *Banbury*, depende da tensão interfacial entre as fases, da viscosidade e da elasticidade dos componentes. O componente com viscosidade mais baixa tende a encapsular o componente mais viscoso (ou mais elástico) assumindo assim, a fase contínua.

O tamanho da fase dispersa é governado pela tensão interfacial e pelas características reológicas dos componentes. A forma dispersa pode variar de esferas até fibrilas, dependendo do processamento aplicado.

Freqüentemente existe uma situação intermediária onde uma fase co-contínua ou mesmo uma rede interpenetrante pode ser originada através do controle da composição, da reologia e das condições de processamento.

Portanto, a morfologia obtida durante o processamento é uma estrutura dinâmica que pode estar sujeita a mudanças, originando sistemas que buscam um equilíbrio.

2.8.4 - APLICAÇÕES GERAIS DE BLENDA POLIMÉRICAS A PARTIR DA QUITOSANA

O fator que determina se uma blenda polimérica específica é apropriada para uma dada aplicação é o perfil de necessidade. A necessidade e a especificação de um material são geralmente determinadas por normas padrões (ex.: ASTM, DIN, ABNT) dentro de um segmento industrial. Estas normas padrões são controlados por requisitos obtidos por ensaios ou medições padronizadas e variam em diferentes países e segmentos industriais.

As principais áreas de aplicação para blendas poliméricas são: o mercado automotivo, seguido da indústria de embalagem, eletro-eletrônicos e eletrodomésticos. Os segmentos industriais de menor aplicação são: o mercado de construção civil e a indústria aeroespacial.

2.9 - BLENIDAS POLIMÉRICAS DE QUITOSANA COM OUTROS POLÍMEROS

2.9.1 - BLENIDAS DE POLIHIDROXIBUTIRATO /QUITINA E QUITOSANA

Ikejima *et al*,2000, estudaram o comportamento de cristalização e meio de biodegradação em blendas de PHB com quitina e quitosana para a aplicação em filmes de bactérias.

Os filmes foram preparados por meio de solução *casting*, tendo o HFIP como solvente comum. Neste trabalho o PHB, quitina e quitosana foram dissolvidas em HFIP antes da mistura, para evitar que a quitina e a quitosana formem gel através do aquecimento e a degradação térmica.

Neste trabalho, verificou-se que a cristalização do PHB nestas blendas foi suprimida quando a quantidade destes polissacarídeos era aumentada, entretanto a quitosana apresentou maior capacidade de supressão da cristalização do PHB quando comparada com a quitina, conforme a Figura 9

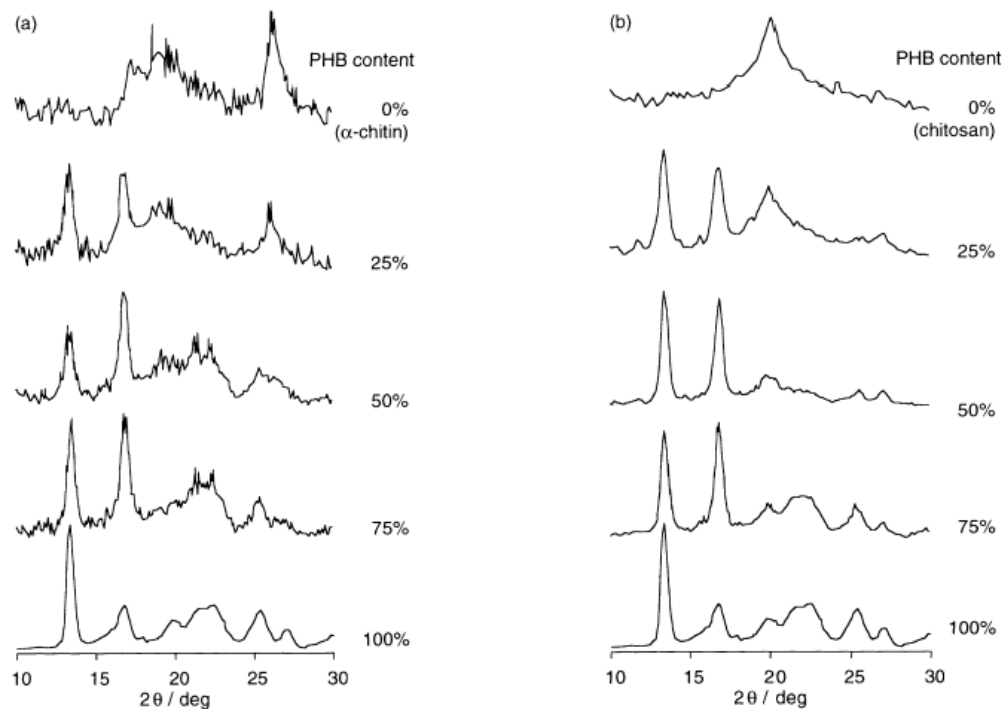


Figura 9 - Difração de raio – x dos filmes de PHB, α -quitina e quitosana, das blendas PHB/ α -quitina e PHB/quitosana: (a) PHB/ α -quitina; (b) PHB/quitosana.

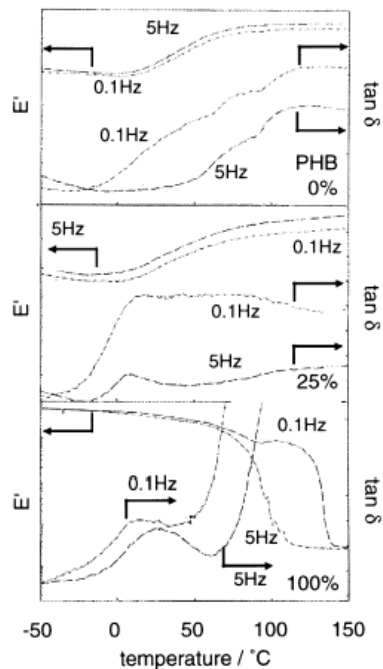
Na Figura 9 estão presentes filmes de quitina, quitosana e blendas contendo 25% de PHB. A figura mostra claramente as difrações que surgem a partir da componente cristalina do PHB, centrada em 13 e 17°.

De acordo com Ikejima e colaboradores, os prováveis fatores que promovem a supressão da temperatura de fusão cristalina (T_m) do PHB na mistura é a diminuição na espessura lamelar dos cristais de PHB e a existência de interações intermoleculares entre PHB e as rígidas moléculas de quitina e quitosana, resultando numa menor flexibilidade da molécula do PHB na mistura e conseqüentemente diminuição da T_m da mistura quando comparada com o PHB puro.

A Figura 10 mostra a viscoelasticidade das blendas de PHB/ α quitina e PHB/quitosana contendo 25 e 50 % de PHB em mesma temperatura, obtida por DMTA. Um método convencional de determinação da T_g usando DSC não pode ser aplicada às blendas de PHB/ α quitina e PHB/quitosana. Os picos de DMTA destas blendas mostram a viscoelasticidade que surge a partir da região amorfa dos componentes das blendas.

O PHB puro exibe uma T_g δ de transição centrada em torno de 15°C, a qual corresponde a T_g do PHB na região amorfa. A temperatura de transição da T_g δ detectada na blenda não pode ser amplamente diferente daquela detectada no PHB puro. A partir deste resultado, o decréscimo na cristalinidade do PHB nas blendas é verificado, podendo ser caudado pela restrição da mobilidade da cadeia do PHB.

As moléculas de quitina e quitosana são rígidas e suas temperaturas de transição são muito elevadas quando comparadas com a do PHB, sendo assim a temperatura de transição na DMTA dos componentes polissacarídeos não podem ser detectadas, devido a dureza dos filmes em altas temperaturas.

(a) PHB/ α -chitin blends

(b) PHB/chitosan blends

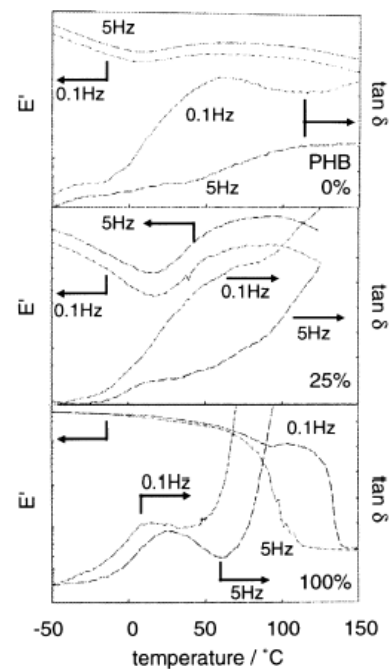


Figura 10 - DMTA do PHB, α - quitina, quitosana e as blendas: (a) PHB/ α - quitina; (b) PHB/quitosana.

2.9.2 - BLENDA DE QUITOSANA COM ÉSTERES DE CELULOSE

As misturas poliméricas, as quais resultam na preparação de novos materiais com melhores propriedades físicas, químicas e mecânicas, faz com que uma devida atenção seja dada para tais misturas poliméricas. As propriedades finais das blendas são determinadas por meio da miscibilidade dos polímeros, a qual favorecida pela formação de pontes de hidrogênio entre os componentes poliméricos. (Chen X. *et al*, 2005).

Chen X., juntamente com seus colaboradores, baseados em estudo já realizados no sentido de analisar a miscibilidade de blendas compostas de quitosana e hidroxipropilcelulose (HPC), estudou e apresentou neste trabalho o resultado obtido com blendas de quitosana (CH) com dois ésteres de celulose, o hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) e metilcelulose (MC). Os estudos foram voltados para a determinação da miscibilidade das blendas formuladas com estes componentes.

Os filmes foram preparados através de solução “*casting*” 0,1M de solução de polímeros em 1% de ácido acético em superfície 2 x 2 x 1 cm de poli(tetrafluoretileno) com posterior secagem em ar a mesma temperatura durante vários dias.

Os difratogramas de alto ângulo das blendas CH/MC presentes na Figura 11, mostram que o filme contendo quitosana pura possui 4 picos de difração ($2\theta = 8.3, 11.28, 18.1, 22.44$), confirmando a presença de domínios cristalinos na estrutura, o que está de acordo com resultados já obtidos por Rihhidj *et al* (2005).

Os difratogramas do HPMC e MC puros revelam que estes são amorfos. Os difratogramas contendo 50% de quitosana mostram picos típicos da quitosana, sendo considerado como uma indicação de imiscibilidade dos polímeros. Para as blendas com 20% de CH o pico é similar a celulose pura, o que indica que esta blenda é mais miscível do que as outras duas. Talvez a miscibilidade desta blenda seja resultado da presença de pontes de hidrogênio via água residual das moléculas.

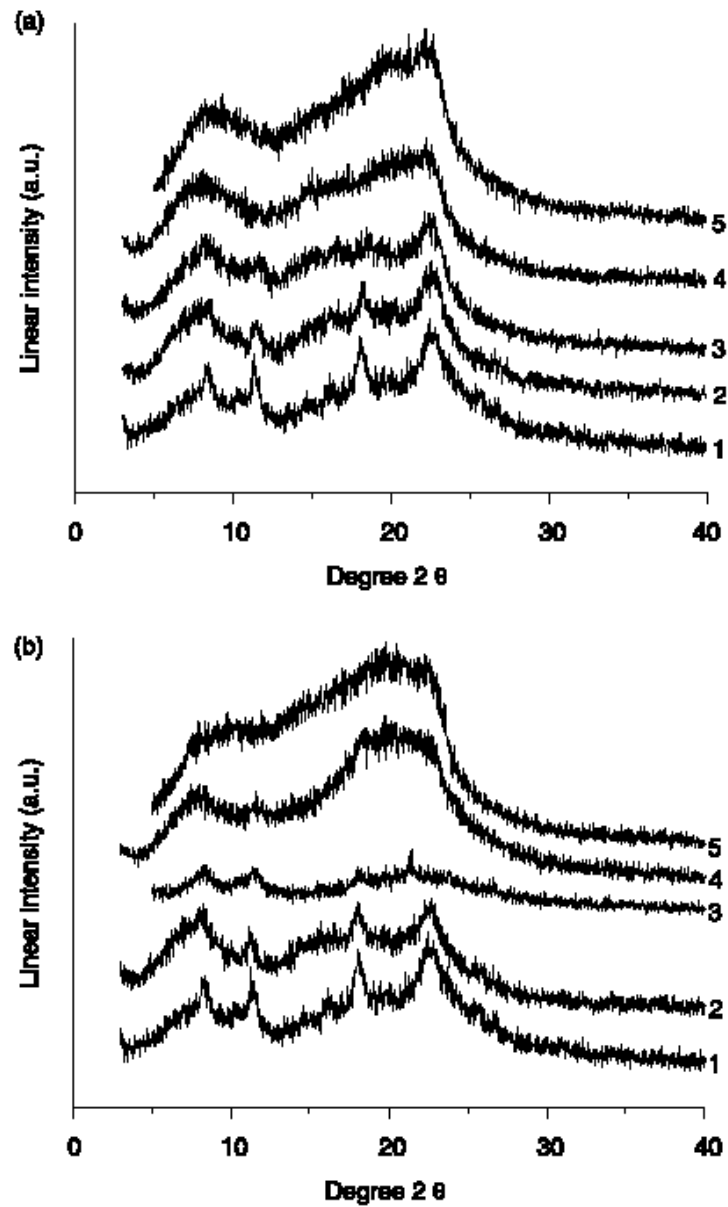


Figura 11 - Difratomogramas de CH/HPMC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of HPMC, (b) difratogramas de CH/MC de blendas contendo 0(1), 20(2), 50(3), 80(4), 100 p% (5) of MC.

A verificação de propriedades dos filmes baseados na quitosana e os ésteres de celulose HPMC e MC revelam, que estes não são miscíveis em blendas.

2.9.3 - BLENIDAS DE QUITOSANA COM CELULOSE

Chao e colaboradores formularam blendas de quitosana/celulose usando ácido trifluoracético (TFA) como co-solvente.

A modificação da quitosana por meios físicos como blendas, por exemplo, pode ser conveniente e eficaz para melhorar propriedades físicas para aplicações práticas.

Estudos de blendas de quitosana com macromoléculas sintéticas e naturais são atrativos fortes nos últimos anos.

As blendas de quitosana/celulose são preparadas com o objetivo de melhorar as propriedades mecânicas da quitosana.

Neste trabalho a celulose e a quitosana foram inicialmente dissolvidas em ácido acético (2,0 m%) e ácido trifluoracético (TFA) respectivamente, para a preparação da solução de celulose e quitosana. São feitas blendas de quitosana/celulose em proporções. Através da técnica de evaporação são produzidos filmes com as seguintes composições finais: 3/1, 1/1 e 1/3 (m/m).

Os resultados da análise dinâmicos - mecânica mostra a tensão “*strangth*” dos filmes em função do índice da quitosana. A tensão *strength* da celulose e quitosana são 63 e 34 N respectivamente. A tensão nas blendas fica em torno de 50N, o que revela o predomínio da celulose.

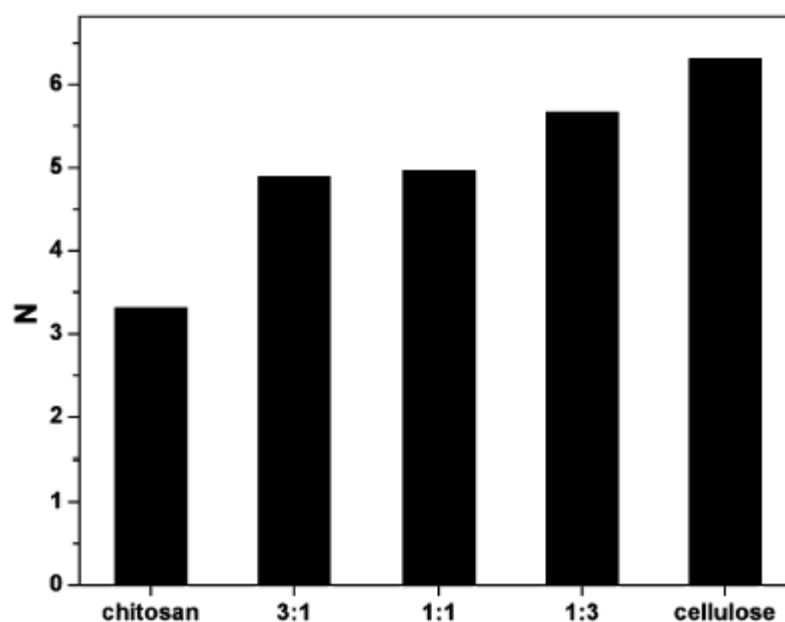


Figura 12 - Tensão “*strangth*” da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

As Figuras 13 e 14 mostram a dependência da temperatura e módulo de armazenamento (E') e (E'') "loss" módulo das blendas de quitosana/celulose e dos polímeros puros. A curva E' e E'' vx temperatura mostra a relaxação característica da celulose, quitosana e blendas. A curva do módulo de armazenamento (E') da quitosana mostra um pico em 0 – 30°, o qual não se vê nas curvas da celulose e blendas. O pico é atribuído a hidratação dos grupos (-CH₂OH) da quitosana. O valor de E' indica que a quitosana pode ser baixo comparado com o a celulose e blendas.

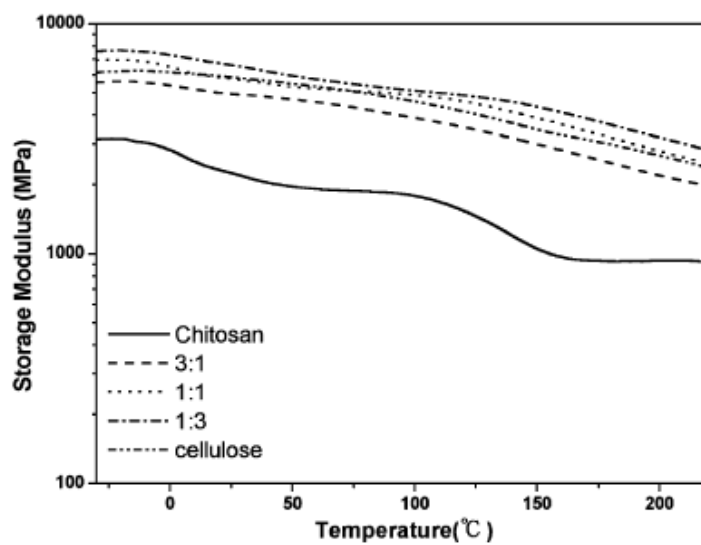


Figura 13 - Módulo de armazenamento (E') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

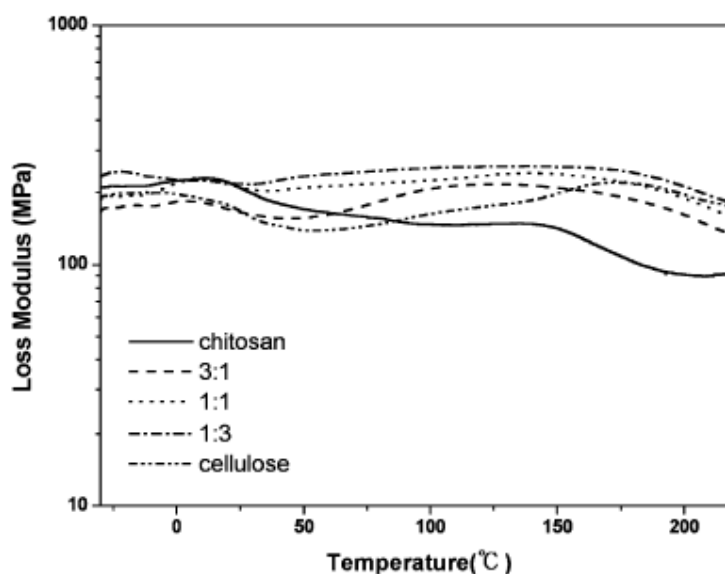


Figura 14 - Módulo "loss" (E'') da celulose, quitosana e quitosana/celulose.

A Figura 15 mostra a dependência da temperatura dos valores da $T_g \delta$ das blendas e polímeros puros.

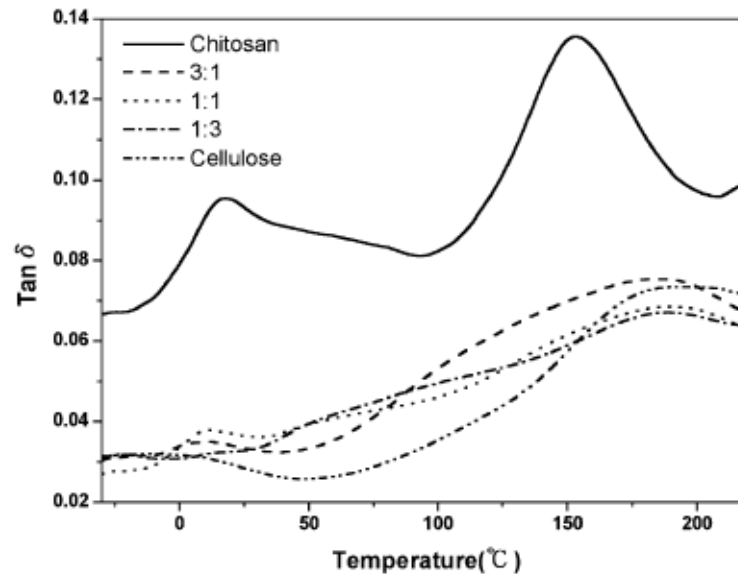


Figura 15 - Dependência da temperatura dos valores da $T_g \delta$ para a celulose, quitosana e quitosana/celulose.

De acordo com o pico da $T_g \delta$ em 190° da celulose, a qual é relatada pelo movimento molecular na região amorfa (Figura 15). A quitosana mostra dois picos em torno de $15 - 22^\circ\text{C}$ e 153°C . O primeiro pico é caracterizado como β relaxação atribuída aos grupos $(-\text{CH}_2\text{OH})$ da quitosana. O segundo pico a 153°C é designado como α relaxação refletindo a temperatura de transição vítrea da quitosana.

Estes resultados levam a concluir que as blendas de quitosana/celulose são imiscíveis. As propriedades térmicas, dinâmico – mecânica das blendas mostram que a celulose predomina. O que não é surpresa do ponto de vista cristalino da celulose uma vez que as ligações de hidrogênio intermolecular da celulose são apropriadas para inibir as ligações de hidrogênio nas blendas.

2.10 – MATERIAIS MAGNÉTICOS

Substâncias magnéticas são aquelas que ao serem colocadas sobre a influência de um campo magnético sofrem forças ou torques. Desta forma podemos classificar os materiais pela forma como eles respondem a um campo magnético aplicado, devido à sua susceptibilidade relativa. A susceptibilidade é calculada em relação ao vácuo sendo definida pela razão existente entre magnetização e campo aplicado (equação 6):

$$\chi = M/H \quad (6)$$

Assim podemos classificar os materiais magnéticos em 3 grupos: os diamagnéticos com $\chi < 1$, os paramagnéticos com $\chi > 1$ e os antiferromagnéticos, ferrimagnéticos e ferromagnéticos com $\chi \gg 1$. Materiais diamagnéticos são aqueles que são repelidos pelos ímãs.

O campo magnético gerado pelo ímã faz com que o movimento dos elétrons se altere, como se uma corrente elétrica estivesse passando pelo material, gerando assim outro campo magnético. Esse campo se alinha em direção oposta ao do ímã, causando a repulsão.

Os paramagnéticos são aqueles materiais atraídos pelos ímãs. Eles possuem elétrons desemparelhados que se alinham na direção do campo magnético, diminuindo a energia. Sem a influência do campo, o material mantém os spins de seus elétrons orientados aleatoriamente. Sendo essa a diferença entre os materiais paramagnéticos e ferromagnéticos.

Os materiais ferromagnéticos são aqueles que mantêm sua magnetização à temperatura ambiente quando submetidos a um pequeno campo externo, como é o caso dos elementos do grupo de transição do ferro, como o cobalto, o ferro e o níquel.

Já os materiais antiferromagnéticos e ferromagnéticos tendem a alinhar seus momentos magnéticos na mesma direção, mas em sentidos opostos. Nos antiferromagnéticos os momentos são antiparalelos e de mesma intensidade resultando em uma magnetização nula, enquanto que nos ferromagnéticos apesar dos momentos serem antiparalelos, os momentos vizinhos possuem diferentes intensidades o que resulta em uma magnetização diferente de zero.

Na Figura 16 temos a representação de forma ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais antiferromagnéticos e ferromagnéticos.

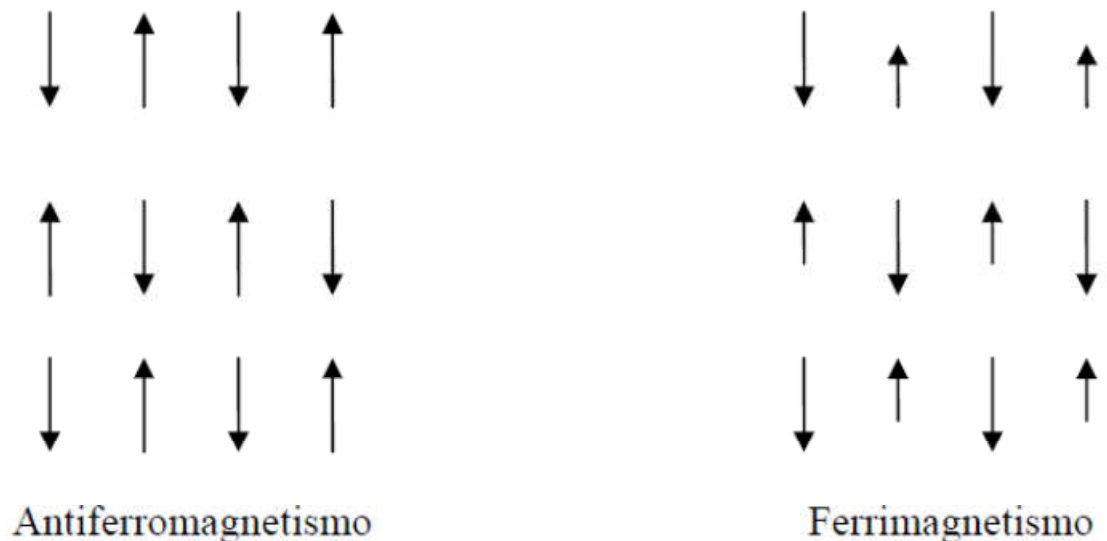


Figura 16 - Representação ilustrativa do ordenamento dos momentos magnéticos vizinhos para materiais anti - e ferromagnéticos.

2.10.1 - CURVAS DE MAGNETIZAÇÃO

Um material ferromagnético virgem (desmagnetizado) possui seus domínios magnéticos distribuídos de tal forma que a magnetização total da amostra torna-se nula, como mostrado na Figura 17a. Quando submetida a um pequeno campo externo ocorrem deslocamento das paredes de domínio para diminuir a energia de Zeeman, causando um aumento na magnetização da amostra devido ao deslocamento reversível das paredes de domínio (Figura 17b).

Entretanto, se o campo aplicado for retirado a amostra volta a ter magnetização nula. Conforme o campo externo vai aumentando as paredes de domínio vão se deslocando e ocorre também a rotação dos domínios perpendiculares ao campo (Figura 17c).

Neste momento se tirarmos o campo externo, a amostra já não vai voltar para a configuração inicial devido às imperfeições do material e apresentará uma magnetização diferente de zero denominada de magnetização remanescente, M_r , que ocorre devido aos deslocamentos irreversíveis dos domínios, que acarretam no

aprisionamento de paredes. Deste modo a amostra estará magnetizada. Este deslocamento das paredes de domínio causado pelo aumento do campo externo irá ocorrer até o momento em que todos os domínios magnéticos estejam com a mesma direção e sentido do campo externo e o material atingirá sua magnetização de saturação (M_s), Figura 17d.

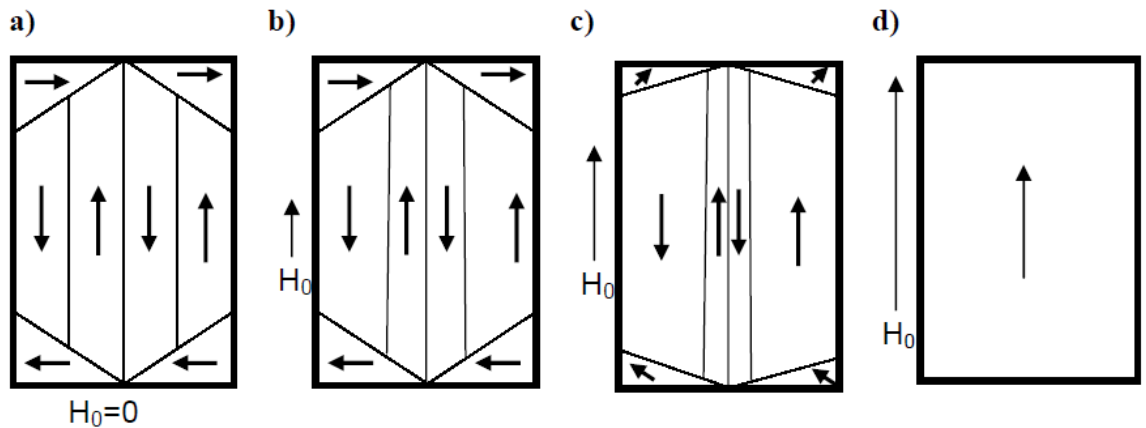


Figura 17 - Esquema ilustrativo da movimentação das paredes de domínio de uma amostra desmagnetizada submetida a um campo externo variável.

Diminuindo o campo aplicado até ficar nulo, encontraremos novamente a M_r . Se continuarmos diminuindo o campo externo, fazendo com que agora o campo esteja no sentido oposto daquele aplicado anteriormente, chegará um ponto onde os domínios magnéticos irão girar deixando a amostra com magnetização nula novamente. Este campo é chamado de campo coercivo (H_c). Fazendo com que o campo aplicado percorra um ciclo completo encontraremos a curva ou ciclo de histerese, como apresentado na Figura 18.

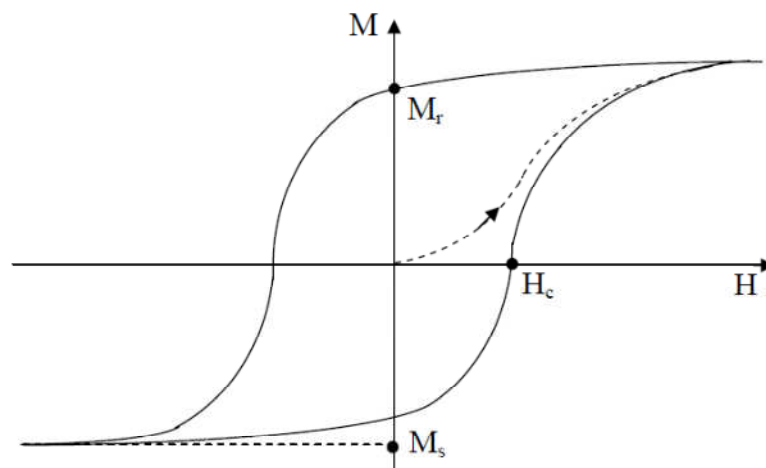


Figura 18 - Representação qualitativa de um ciclo de histerese

2.11 – BIODIESEL

A crescente preocupação com o aquecimento global neste início do séc. XXI incentiva as discussões sobre novas fontes de energia. Em todo o mundo já se discute a viabilidade dos combustíveis renováveis, que causariam um impacto muito menor no aquecimento do planeta (Gonçalves et. al., 2005). O biodiesel ganhou importância pela sua capacidade de substituir os combustíveis fósseis (Muthu, 2008).

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

O biodiesel é definido como um mono alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa derivados de óleos vegetais ou gorduras animais. O seu conteúdo de energia e as propriedades físicas e químicas são semelhantes ao óleo diesel convencional.

Para se produzir o biodiesel, o óleo retirado das plantas ou animais é misturado com etanol (ou metanol) e depois estimulado por um catalisador. Este processo químico é denominado de transesterificação, onde a glicerina é separada da gordura ou do óleo vegetal. O processo gera dois produtos, ésteres (o nome dado ao biodiesel) e glicerina (produto valorizado no mercado de sabões). A Figura 18 mostra o esquema de produção do biodiesel (Furigo et. al., 2009).

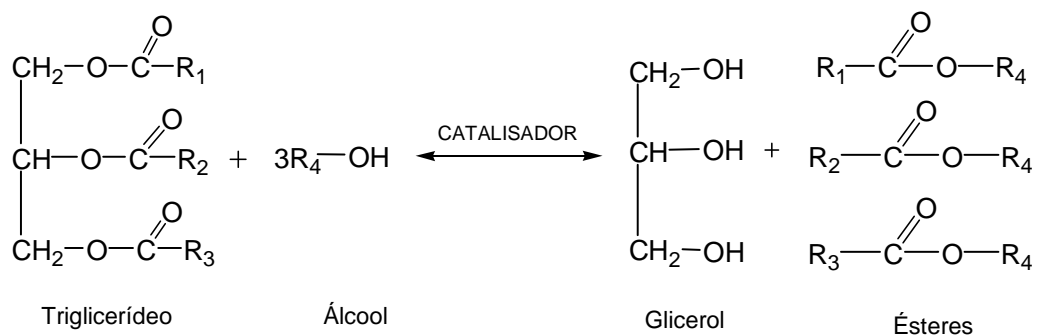


Figura 19 - Esquema resumida da produção de biodiesel.

2.11.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS NA PRODUÇÃO DE BIODIESEL

Vários trabalhos têm ilustrado a capacidade das enzimas imobilizadas na produção do biodiesel como catalisador.

Liu e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo onde utilizaram células *Saccharomyces cerevisiae* imobilizadas em partículas magnéticas, para a fermentação do etanol em um reator de leito fluidizado magneticamente estabilizado (MSFBR). O objetivo do trabalho é investigar o desenvolvimento da fermentação do etanol no MSFBR com células imobilizadas em alginato com ferrita.

Para utilizar este sistema (MSFBR) desenvolvido para a produção de etanol a partir de matérias-primas baratas, o melaço de cana foi utilizado como substrato com as células imobilizadas no sistema do reator.

O reator estabilizado magneticamente de leito fluidizado (MSFBR) oferece inúmeras vantagens sobre o leito fluidizado convencional, como a eliminação de resíduos sólidos da mistura, baixa variação de pressão através do leito, facilidade de transporte de sólido, bem como a possibilidade de operação de aumento de velocidade de fluidos e até mesmo a operação em contra corrente. E a produtividade do etanol foi maior no MSFBR que em um reator de leito fluido convencional, sem campo magnético.

Chang e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a síntese do biodiesel a partir do óleo de cozinha em um reator, catalisada para lipase imobilizada para substituir parcialmente o diesel do petróleo. A reação de transesterificação foi realizada utilizando uma imobilização barata da lipase absorvida em tecido têxtil, a fim de reduzir os custos do biodiesel.

O estudo mostrou que o óleo de cozinha usado pode ser suficientemente convertido em biodiesel e demonstra uma abordagem eficaz para reduzir o custo da matéria-prima do biodiesel e lipase, e também para reduzir os problemas de poluição.

Iso e seus colaboradores (2001) realizaram um estudo que trata da produção de biodiesel através da reação de transesterificação utilizando lipase imobilizada, que foi realizado através de partículas de caulita porosa como um portador.

Resultados mostram que a lipase *Pseudomonas fluorescens* imobilizada tem maior atividade que a lipase livre.

Keskinler e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a produção de biodiesel 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. Descreve a síntese do copolímero estireno-divinilbenzeno-poliglutaraldeído (STY-DVB-PGA) imobilizado por lipases para produzir biodiesel a partir de óleo de canola. O copolímero sintetizado foi utilizado para imobilizar a enzima, sendo a imobilização realizada por ligação covalente da enzima sobre a superfície interna do microporo hidrofóbico do poli (estireno-divinilbenzeno). A lipase foi totalmente imobilizada com sucesso no copolímero estireno-divinilbenzeno-poliglutaraldeído.

Alves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo sobre o reaproveitamento de lipase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. O comportamento da lipase imobilizada foi estudado após cada batelada de produção de biodiesel. A reação foi realizada tendo como substrato óleo de babaçu e a enzima empregada como catalisador foi a lipase comercial, os experimentos foram conduzidos por um período de 72h, a temperatura ambiente.

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. Os resultados mostraram que a enzima não apresentou grande perda de atividade podendo ser utilizada em diversos ciclos de produção, e o um solvente utilizado na lavagem do suporte entre os ciclos de produção tem influência na atividade da enzima.

Zong e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre a transformação de resíduos de óleo para biodiesel por lipase *Penicillium expansum* imobilizada. Sendo que a imobilização da lipase mostrou ser um eficiente biocatalizador para a produção de biodiesel a partir de resíduos de petróleo com alto valor de solvente ácido orgânico. Foi que revelou que a água a partir da esterificação de ácidos graxos livres e metanol proibindo um melhor rendimento de éster de metil. Adsorventes poderia efetivamente controlar a concentração de água no sistema de reação, resultando em um melhor rendimento de éster de metil. Sílica-gel foi provada ser o melhor adsorvente, proporcionando um rendimento de éster de metil de 92,8%

após 7 horas. Além disso, a preparação enzimática exibiu uma maior estabilidade de óleos usados do que óleo de milho, com 68,4% da atividade enzimática original depois de serem reutilizados mantidos por 12 lotes.

Salis e seus colaboradores (2008) realizaram um estudo utilizando oito tipos de lipases comerciais em macro poros de propileno para a síntese de biodiesel que foram caracterizadas (teor de proteína e atividade específica) e imobilizadas em macro poros de propileno através da adsorção. As lipases apresentaram um nível diferente de adaptação ao suporte, conforme determinado pela comparação de sua eficiência catalítica (atividade/carregamento).

A imobilização das lipases foi comparada com a *metanolisis* do óleo vegetal para obter biodiesel em condições livres de solvente. Das oito lipases imobilizadas somente aquelas de espécies *Pseudomonas fluorescens* foram ativas (rendimento do éster=58 mol% após 22 horas), seguido por imobilização da lipase *Pseudomonas cepacia* (rendimento do éster=37 mol% após 51,5 horas), enquanto todas as outras lipases foram inativas na síntese do biodiesel. Sob condições ideais de temperatura, teor de água e carga obteve um rendimento de éster 98 mol% após 70 horas.

Ettayebi e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo tendo como objetivo a produção de etanol a partir do amido por imobilização de *Candida tropicalis*, na presença de α -amilase. *Candida tropicalis* é um organismo potencialmente útil para a produção comercial do etanol, uma vez que é capaz de fermentar em um amido e demonstra que é um sistema atraente para a produção de biocombustível. O presente trabalho demonstrou que o pré-tratamento de amido com α -amilase é suficiente para obter uma completa fermentação por imobilização livre da *Candida tropicalis*.

A produção industrial de bio-etanol por fermentação direta e liquefação do amido, será muito efetiva na redução nos custos da produção do etanol. Isto levou aos autores a sugerir a utilizar este processo de fermentação do amido em repetitivos lotes ou fermentação contínua para um adicional melhora na produção de bio-etanol, sendo que estudos com *Candida tropicalis* expressando α -amilase e celulosas são promissores e conduzirá uma valiosa aplicação na produção do combustível etanol a partir de fontes renováveis e na conversão do milho em etanol.

O uso de enzimas como catalisadores da reação de transesterificação para produção de Biodiesel, tem se tornado uma opção bastante atrativa, devido a especificidade das enzimas e dos benefícios ambientais e econômicos decorrentes

da utilização deste biocombustível. Rampim e seus colaboradores (2006) tiveram como objetivo, realizar o estudo da lipase de *Thermomices lanuginosus* em particular, na catálise de reações que utilizam óleo de soja e etanol como material de partida.

Na Figura 20, pode-se observar a conversão dos TGs (moléculas de triacilglicerídeos) presentes no óleo de soja em produto final da reação de transesterificação, os ésteres etílicos correspondentes.

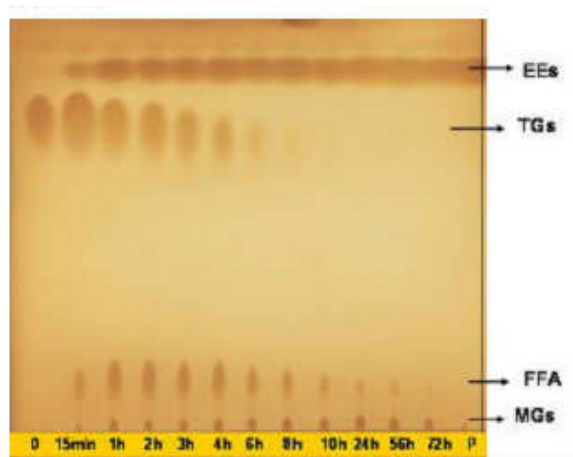


Figura 20 – TLC de 0 a 72horas da mistura reacional da reação de etanolise do óleo de soja para a produção de biodiesel

Na Figura 20, tem-se em 0 óleo de soja e de 15 min. a 72horas pode-se observar o processo da reação. Inicialmente a formação de ácidos graxos livres (FFA) e (mono) glicerídeos (MGs) a partir das moléculas de triacilglicerídeos (TGs) e por último ocorre a conversão destes a ésteres etílicos (EEs).

Tan e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com síntese enzimática de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAMES) a partir da banha imobilizada com *candida sp. 99-125* na produção do biodiesel. O efeito da temperatura, teor de água, quantidade de enzima, solvente e três etapas da metanolisis foram investigados. Tem sido demonstrado que o custo da lipase é grande parte do custo total da produção de biodiesel, e uma das principais vantagens de uma lipase imobilizada é que pode ser repetidamente utilizada durante um período de tempo.

Para investigar a estabilidade da lipase, três etapas da metanolisis foram repetidas a cada 30 horas de cada ciclo, a lipase foi transferida para o mesmo sistema para um novo ciclo. A Figura 21, não evidencia diminuição na atividade da

lipase, que foi observado durante os primeiros 7 ciclos. Rendimentos dos FAMEs foi superior a 80% obtidas durante até o ciclo 7, que mostrou um rendimento de 76,2% e no entanto, o rendimento do ciclo 8 foi apenas de 34,7%.

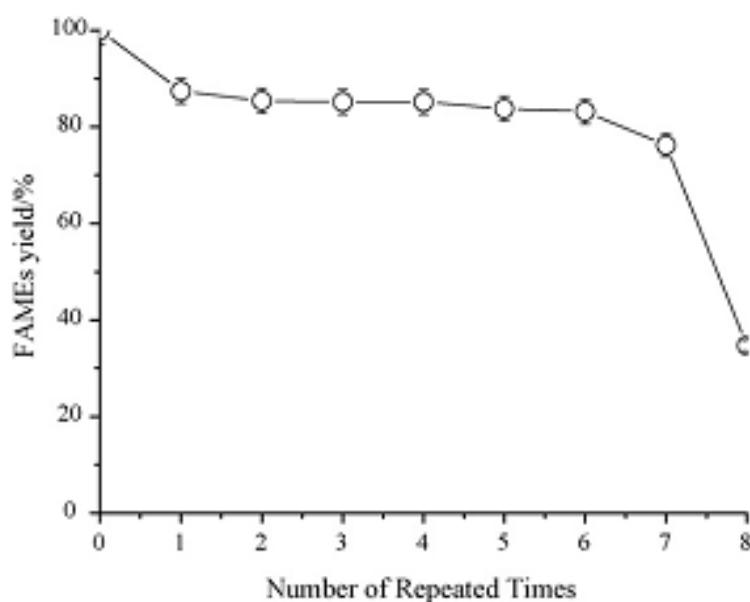


Figura 21 – Estabilidade da lipase imobilizada por repetidos ciclos.

Assim a lipase poderia manter a sua atividade durante pelo menos 180 horas. Estes resultados mostraram que os 3 passos da metanolis com *Candida sp. 99-1t25* imobilizada é eficaz para a produção de biodiesel.

Ettayebi e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo com a produção do etanol a partir do amido por imobilização de *Candida tropicalis*, na presença de α -amilase. A *Candida tropicalis* é um organismo potencialmente útil para a produção comercial do etanol a partir da fermentação em um amido, para aumentar a utilização desta fonte de carbono e aumentar a taxa de produção de álcool, nos pré-amido de milho α -amilase, foi utilizada a liquefação do amido que foi suficiente para conduzir a fermentação e para converter 96% de substrato para etanol. Obteve um estudo prévio da viabilidade de produzir etanol a partir da glicose por esta levedura, espécies tanto quanto as células livres ou imobilizadas tanto fenóis e polifenóis em concentrações que são altamente tóxicas para bactérias e outras espécies, demonstrou que é um sistema atraente para a produção de bicomcombustível a partir de recursos renováveis.

Keskinler e seus colaboradores (2009) relatam o estudo da síntese de lipase catalisada por ácidos graxos ésteres de metil (biodiesel) de vários óleos vegetais que usam lipase imobilizada sobre uma matriz polimérica microporosa em diferentes

formas, como um barato biocatalizador. A pesquisa é focalizada em 3 aspectos do processo: (a) síntese, (b) biocatalise de polímeros microporosos e preparação por imobilização da lipase sobre o polímero, e (c) produção do biodiesel. A matriz microporosa do polímero contendo grupo funcional aldeído foi sintetizado pela técnica de poliHIPE que usa estireno, divinilbenzeno, e poliglutaraldeído. A lipase *thermomyces lamuginosus* por ligação covalente é presa sobre o polímero com 80%, 85% e 89% de eficiência na imobilização. A enzima imobilizada foi usada para a produção de biodiesel que usa três óleos diferentes o óleo de girassol, óleo de soja e óleo de cozinha, mostra que a imobilização de enzimas tem atividade durante 10 repetidas reações a 25°C, a cada 24h.

A Figura 22 mostra 3 tipos de óleos diferentes 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%. Este método moderno e simples desenvolvido e efetivo, poderá ter um potencial a ser usado na indústria para a produção de substâncias químicas que requerem enzimas imobilizadas.

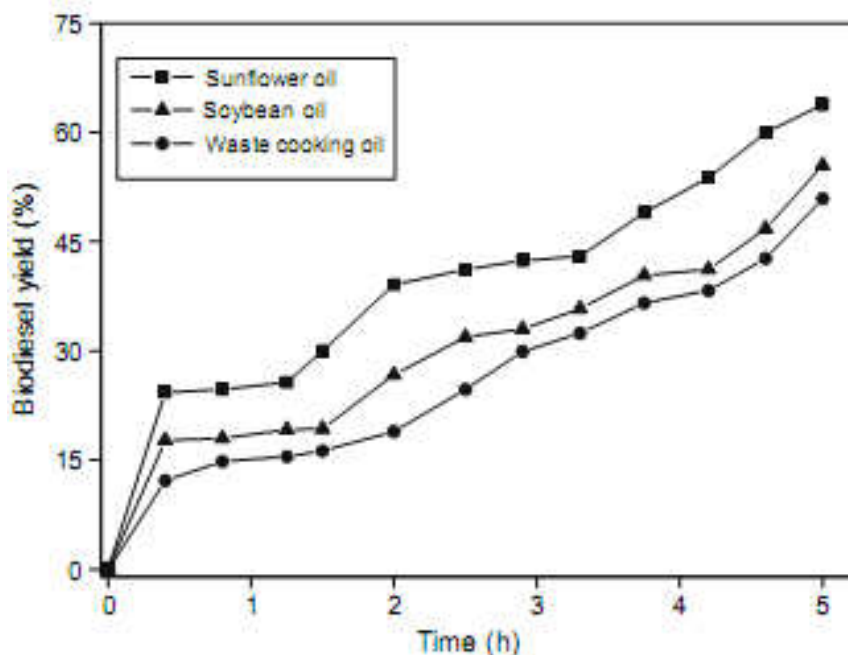


Figura 22 – Variação da eficiência da produção de biodiesel com o tempo para o óleo de girassol, soja e o óleo de cozinha desperdiçado (condições de operação: substrato 21mL/min, temperatura 65°C, reação total 5h)

2.11.2 – PROCESSOS CATALÍTICOS PARA OBTENÇÃO DE BIODIESEL

O termo biocatálise ou biotransformação, de maneira geral, abrange os processos em que um catalisador biológico é utilizado para conversão de um substrato em um número limitado de etapas (Oliveira *et. al.*, 2009).

Em geral, o ponto de partida para a escolha de um biocatalisador envolve a especificidade (químio-, régio-, enantiosseletividade) e a velocidade que a transformação é desejada e é efetuada (Oliveira *et. al.*, 2009).

A biocatálise é hoje um dos campos mais promissores dentro de novas tecnologias para a síntese de compostos de alto valor agregado. A exploração da biodiversidade na busca de novos catalisadores por técnicas de seleção de microorganismos, de plantas ou células representam os métodos tradicionais de descobertas de novas enzimas para o desenvolvimento da biocatálise em escala industrial (Carvalho *et. al.*, 2005).

A biocatálise moderna está a desenvolver novas ferramentas e é preciso melhorar uma vasta gama de processos de produção, que reduzem o consumo de energia e matérias-primas e gerar materiais com menos resíduo e produtos secundários tóxicos. Biocatálise é também conseguir novos avanços na área do meio ambiente, de biorremediação enzimática para a síntese das energias renováveis e limpas (Alcalde *et. al.*, 2006).

Atualmente o biodiesel é essencialmente produzido a partir do óleo retirado das plantas e animais por um processo de transesterificação, envolvendo álcool (metanol ou etanol) e um catalisador, homogêneo ou heterogêneo. Quimicamente, o biodiesel é descrito como uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos (ésteres mono, di e triglicerídeos). A glicerina, subproduto da reação de transesterificação, pode ser usada na indústria farmacêutica e cosmética (Bordado *et. al.*, 2008).

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. Este

processo pode ser conduzido na presença de catalisadores ácidos, básicos e enzimáticos.

A catálise é o fenômeno em que uma quantidade relativamente pequena de um material estranho à estequiometria – o catalisador – aumenta a velocidade de uma reação química sem ser consumido no processo. A reação catalítica é, pois uma sequência fechada de etapas elementares, análogas à propagação numa reação em cadeia (Guimarães, 2007).

A reação de transesterificação pode ser catalisada por catalisadores homogêneos e heterogêneos. Os catalisadores homogêneos incluem alquis e ácidos. Os catalisadores alcalinos mais usados são hidróxido de sódio, metóxido de sódio e hidróxido de potássio. Ácido sulfúrico e ácido clorídrico são geralmente preferidos como catalisadores ácidos, os catalisadores heterogêneos incluem enzimas.

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 sabonetes que são reações indesejáveis, porque consomem parcialmente o catalisador, diminui o rendimento do biodiesel e complica a separação e purificação (Aracil, *et. al.*, 2004).

Na catálise homogênea, o catalisador e os reagentes estão dispersos na mesma fase, enquanto que na catálise heterogênea, o catalisador constitui uma fase separada. Neste caso a reação química ocorre na interface entre as duas fases, e a velocidade será, em princípio, proporcional à área respectiva. O catalisador é uma macromolécula (enzima), cuja superfície não é uniforme. As reações ocorrem em locais específicos da superfície, os centros ativos (Guimarães, 2007).

A catálise heterogênea tem despertado grande interesse nos setores produtivos e acadêmico-científico. Estes catalisadores apresentam uma série de vantagens bem conhecidas, em relação aos catalisadores homogêneos, como facilidade de isolamento do produto de reação, a possibilidade de obtenção de produtos com alto grau de pureza e de regeneração e reutilização do catalisador, além de não serem corrosivas e dispensarem a etapa de lavagem do produto, o que representa menor geração de resíduos (Soldi *et. al.*, 2007).

Para fazer face às dificuldades encontradas com a utilização dos atuais e convencionais catalisadores homogêneos, nos processos de separação biodiesel/catalisador, começa a ser empregada uma linha alternativa de

catalisadores sólidos, daí designar-se por catálise heterogênea. Por outro lado, estas soluções alternativas e inovadoras de produção de biodiesel permitem rentabilizar economicamente o processo produtivo, tornando-o mais competitivo e também mais sustentável do ponto de vista ambiental.

Neste aspecto, a utilização de sistemas catalíticos heterogêneo para a transesterificação dos triglicerídeos em biodiesel implicará 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 implementado em regime de funcionamento contínuo processual (Bordado *et. al.*, 2008).

A biocatálise se encontra em amplo desenvolvimento atualmente. Pesquisa realizada em vários ramos da química e da biologia tem como principal objetivo desenvolvimento de novos catalisadores para uso industrial. Novas técnicas de biologia molecular, metodologias de seleção de biocatalisadores e novas abordagens de pesquisa, foram desenvolvidas a fim de se obter catalisadores com suas especificidades alteradas, bem como a exploração da biodiversidade. Enzimas mais compatíveis com solventes orgânicos e altas temperaturas estão se tornando mais disponíveis, o que certamente levará as indústrias a utilizarem a biocatálise como uma alternativa técnica em comparação com os catalisadores atuais (Conti *et. al.*, 2001).

Dentre as perspectivas para o desenvolvimento do setor biotecnológico no Brasil, apesar do crescimento econômico brasileiro e as políticas governamentais estarem favoráveis nos últimos anos (o decreto de regulamentação da Lei de Inovação Tecnológica foi assinado pelo presidente Luiz Inácio Lula da Silva no dia 11/10/2005), uma maior interação entre a academia e o setor privado é uma estratégia fundamental para delimitar os problemas que entram o desenvolvimento de programas de treinamento mais específicos de acordo com o interesse industrial dentro das universidades (Oliveira *et. al.*, 2009). Sendo que o Brasil apresenta uma grande vantagem territorial e climática, com uma imensurável biodiversidade ainda pouco explorada.

É importante que a comunidade reflita e lute para promover as interações necessárias, muitas vezes com o laboratório vizinho, vislumbrando o crescimento que pode ser gerado em termos de conhecimento e projetando ainda mais a

visibilidade da Química e outras ciências no âmbito nacional e internacional (Soldi *et al.*, 2007).

2.12 – BIOCATALISADORES

Enzimas são catalisadores biológicos, constituídos de proteínas ou glicoproteínas, que participam de muitas reações químicas nos seres vivos. Ao contrário dos catalisadores químicos, as enzimas catalisam as reações em condições muito brandas, geralmente em soluções aquosas neutras, a temperatura e pressão ambientes. As enzimas também se caracterizam pela especificidade em relação ao substrato, algumas atuando num limitado grupo de compostos, enquanto outras agindo quase que exclusivamente sobre um único substrato (Trevisan, 1993).

As enzimas são usadas há muito tempo, mesmo antes de serem conhecidas, e seu uso estendeu-se gradualmente à produção de bebidas, alimentos, têxteis e medicina. O desenvolvimento da bioquímica, a elucidação dos mecanismos de reação e o desenvolvimento de novas fontes de enzimas diversificaram as suas aplicações (Trevisan, 1993).

As características mais marcantes das enzimas são o seu poder catalítico e sua especificidade. As enzimas têm um enorme poder catalítico. Elas aceleram reações, multiplicando suas velocidades por fatores de, pelo menos, um milhão. De fato, a maioria das reações em sistemas biológicos não ocorre com velocidades perceptíveis na ausência de enzimas (Comerlato, 1995).

2.13 – IMOBILIZAÇÕES DE ENZIMAS

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 solúveis 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 comparada 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)

2.14 – MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos (Nascimento *et. al.*, 2004).

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 (Nascimento *et. al.*, 2004).

Na literatura, inúmeros métodos têm sido descritos e utilizados para contornar os possíveis problemas de instabilidade e otimizar as várias aplicações (Nascimento *et. al.*, 2004).

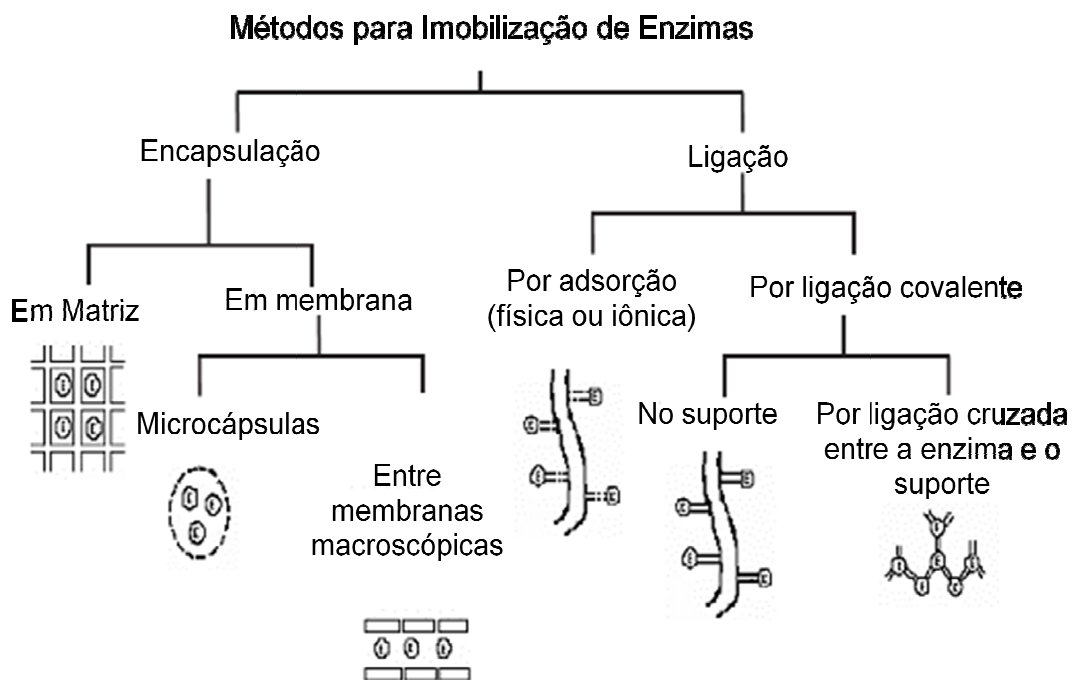


Figura 23 – Métodos de imobilização de enzimas (Nascimento *et al.*, 2004).

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento através de uma membrana polimérica. A Figura 23 mostra, esquematicamente, a classificação dos métodos utilizados para imobilização de enzimas (Nascimento *et. al.*, 2004).

- LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE

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 (Figura 24).

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 com 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 matam a atividade catalítica das enzimas (Comerlato, 1995).

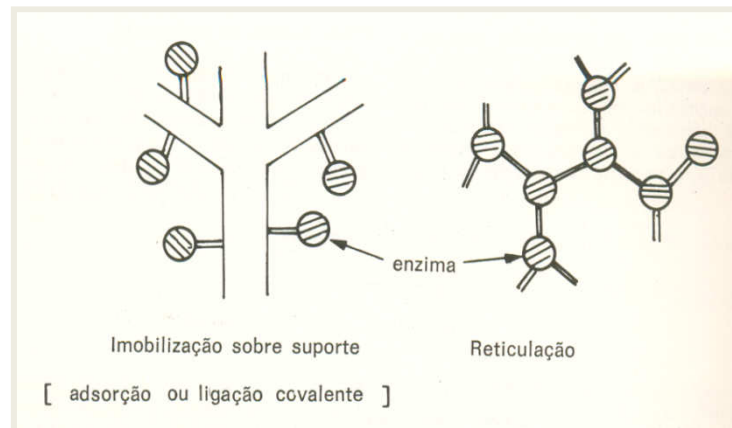


Figura 24 – Imobilização de enzimas sobre suporte.

- LIGAÇÃO COVALENTE CRUZADA

O método baseia-se na formação de partículas macroscópicas em decorrência da formação de ligações covalentes cruzadas entre as moléculas de enzima e/ou suporte inerte. 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 as variações de pH, força iônica, solventes e temperatura (Comerlato, 1995).

- ADSORÇÃO

Este método consiste na adsorção da enzima em um suporte inerte, através de ligações eletrostáticas ou hidrofóbicas, tais como interações iônicas, forças de “van der waals”, ligações de hidrogênio e interações dipolo-dipolo (Figura 25). Este tipo de imobilização causa uma pequena modificação na estrutura nativa da enzima se comparando aos outros tipos de imobilização e, por isso, geralmente não promove perda da atividade catalítica.

A adsorção depende do pH da solução enzimática, obtendo-se valores máximos de adsorção em valores próximos ao ponto isoelétrico da proteína. Esta situação pode ser explicada pelo fato de que, no valor de pH correspondente ao

ponto isoelétrico da proteína, a repulsão eletrostática entre as moléculas de proteína é minimizada. A adsorção de enzimas em superfícies pode induzir a algumas alterações conformacionais na molécula da enzima devido a interações entre a enzima e o suporte. Suportes hidrofóbicos conseguem adsorver maiores quantidades de enzima e a densidade da camada de adsorção também pode ser maior, relativamente aos suportes hidrofílicos.

Estes resultados indicam que as interações entre a enzima e o suporte são bastante fortes nos suportes hidrofóbicos, o que pode causar, em alguns casos, maiores alterações conformacionais na enzima. Quando se utiliza suportes menos hidrofóbicos, a retenção da atividade aumenta, mas a quantidade de proteína adsorvida diminui e as interações entre a enzima e o suporte serão menores. Este tipo de imobilização pode também ser considerado como uma etapa de purificação da enzima, uma vez que a proteína pode ser seletivamente adsorvida sobre o suporte (Machado *et. al.* 2008).

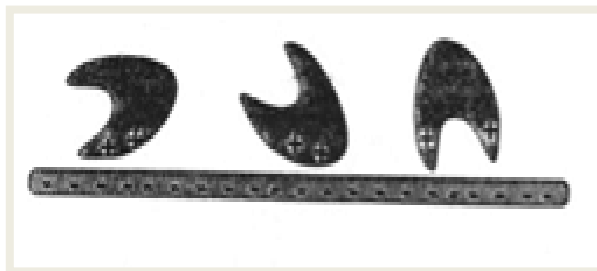


Figura 25 – Método de imobilização de enzima por adsorção em um suporte inerte .

Para melhorar a biocompatibilidade da superfície de suporte para a imobilização de enzimas, Xu e seus colaboradores (2007) criaram um microambiente específico para as enzimas e, assim, beneficiaram a atividade da enzima. Neste trabalho, uma macromolécula natural, a quitosana, foi presa em uma superfície de poli (acrilonitrila-co-ácido maléico) (PANCMMA) para preparar um suporte de camada dupla para a imobilização de enzimas.

Este apoio foi utilizado para a imobilização da enzima por adsorção física. A quitosana tem sido utilizada com sucesso como suporte para imobilização de enzimas e contém uma grande quantidade de proteína, grupos aminoácidos que atuam como grupos de afinidade. A Figura 26 mostra um esquema para a preparação de apoio e de imobilização de enzimas por adsorção. Conclui-se que o

suporte de camada dupla é um suporte potencial na tecnologia de imobilização de enzimas.

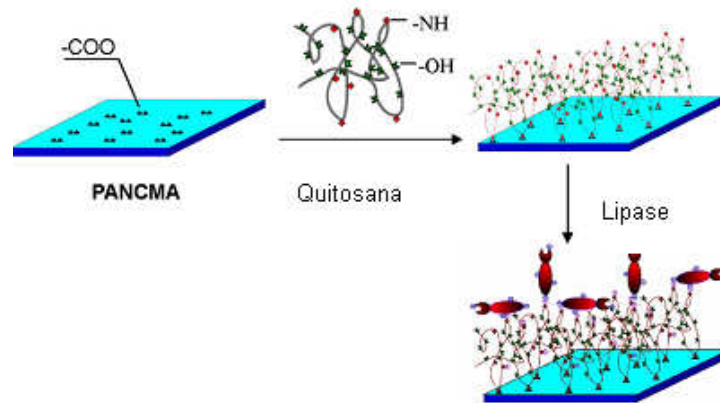


Figura 26 – Representação esquemática da preparação do apoio e imobilização da lipase por adsorção (Xu et. al, 2007).

Besteti e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo desenvolvendo partículas poliméricas para imobilização de enzimas, através da técnica de adsorção física. Os suportes empregados devem apresentar características químicas e morfológicas adequadas para a interação com a proteína. Os polímeros obtidos apresentam caráter poroso, gerando parâmetros de imobilização superiores a de um suporte comercial.

Os materiais poliméricos desenvolvidos foram usados para a imobilização da lipase B de cândida Antártica. O desempenho dessas partículas foi comparado com um suporte disponível comercialmente, Accurel MP 1000, que é à base do pilpropileno. O suporte produzido foi com o núcleo de poli (estireno) e casca de poli (metacrilato de metila), sendo que exibem características morfológicas similares às de um suporte comercial. Os parâmetros de imobilização, para a maioria dos materiais, foram superiores ao do suporte comercial usado com base de comparação.

- CONFINAMENTO EM MATRIZ OU EM CÁPSULAS

A imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento consiste em “confinar” uma proteína em um polímero insolúvel ou em uma microcápsula (Figura 27). A microencapsulação é muito similar ao processo de inclusão, embora neste caso a enzima seja totalmente envolvida pelo sistema. Neste

sistema, cria-se uma cela artificial delimitada por uma membrana porosa. Moléculas grandes, tais como enzimas, não são capazes de se difundir através desta membrana, enquanto que pequenas moléculas como substratos e produtos se difundem (Nascimento *et. al.*, 2004).

A vantagem da utilização desta técnica é que a enzima não interage quimicamente com o polímero evitando, assim, a desnaturação. Contudo, a transferência de massa através da membrana pode ser um problema. A velocidade de difusão dos substratos e produtos através da membrana é um fator limitante e geralmente são necessárias altas concentrações de substratos a fim de limitar esta influência. As enzimas encapsuladas apresentam atividade mais elevada em substratos de baixa massa molar, pois estes compostos se difundem pela membrana e se aproximam com mais facilidade do sítio ativo do biocatalisador (Nascimento *et. al.*, 2004).

Microencapsulamento de enzimas tem demonstrado ser uma técnica de sucesso de imobilização. As microcápsulas podem ser facilmente separadas do meio reacional por filtração, e as enzimas imobilizadas têm um potencial de serem utilizadas em vários lotes (Neau *et. al.*, 2002).



Figura 27 – Imobilização de um biocatalisador via inclusão ou microencapsulamento.

Neau e seus colaboradores (2002) realizaram um estudo com objetivo de imobilizar a lipase de *candida rugosa* utilizando diferentes polímeros para avaliar o carregamento de enzimas, atividade e caracterização. Agarose, alginato e quitosana foram selecionados para imobilizar a lipase, sendo usada a técnica de microencapsulamento.

As esferas de agarose exibiram indesejáveis inchaços, atividade média e o polímero não foi utilizado, esferas de alginato e de quitosana foram preparados por gelatificação iônica. A lipase pode ser imobilizada com sucesso pelo confinamento em esferas de alginato e de gel de quitosana, a eficiência do confinamento por esferas de alginato ou de quitosana não foi alterada pela diferença do tipo de polímero. A eficiência do confinamento foi de 44-50% em ambos os tipos, mas a atividade enzimática é menor no alginato. A maior atividade de enzimas em esferas de quitosana comparadas às esferas de alginato pode ser atribuída a interação do alginato com a enzima.

Nas esferas secas-congeladas também não a atividade da lipase contendo esferas de alginato e quitosana. A Figura 28 mostra a atividade significativa da esfera de quitosana a 2,0%(m/v).

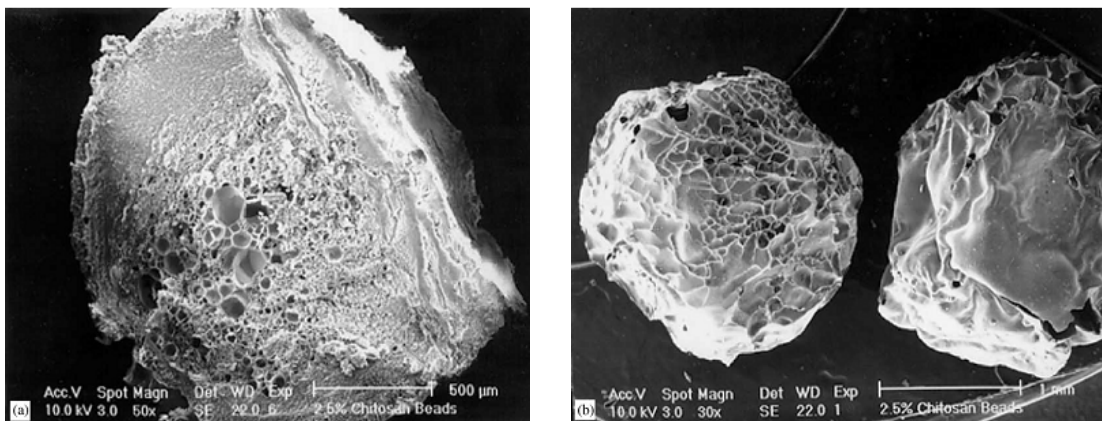


Figura 28 – Microscopia eletrônica (a) corte transversal (b) superfície, esferas de quitosana a 2,0%(m/v).

As técnicas de confinamento e encapsulamento sobre polímeros naturais são cada vez mais conhecidas, devido a seu baixo custo, processo de reutilização, ausência de toxicidade e bom para o meio ambiente. Encapsulamento de enzima é o confinamento físico das enzimas dentro de uma membrana polimérica pela fase de transição do soluto (polímero) contendo a enzima (Ravindra *et al.*, 2009).

Ravindra e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo com uma nova abordagem para a imobilização da lipase *Burkholderia cepacia* encapsulada em k-carragenina. Nenhuma tentativa foi feita para encapsular enzima em k-carragenina formando cápsulas com o núcleo líquido. O encapsulamento da lipase em k-carragenina foi realizado através de co-extrusão, as cápsulas da lipase eram de forma esférica com diâmetro na faixa de 1,3-1,8mm e uma espessura de 200µm

(figura 29). Na foto da lipase, encapsulada pode ser observado o núcleo interno da solução da lipase e o exterior do núcleo k-carragenina.

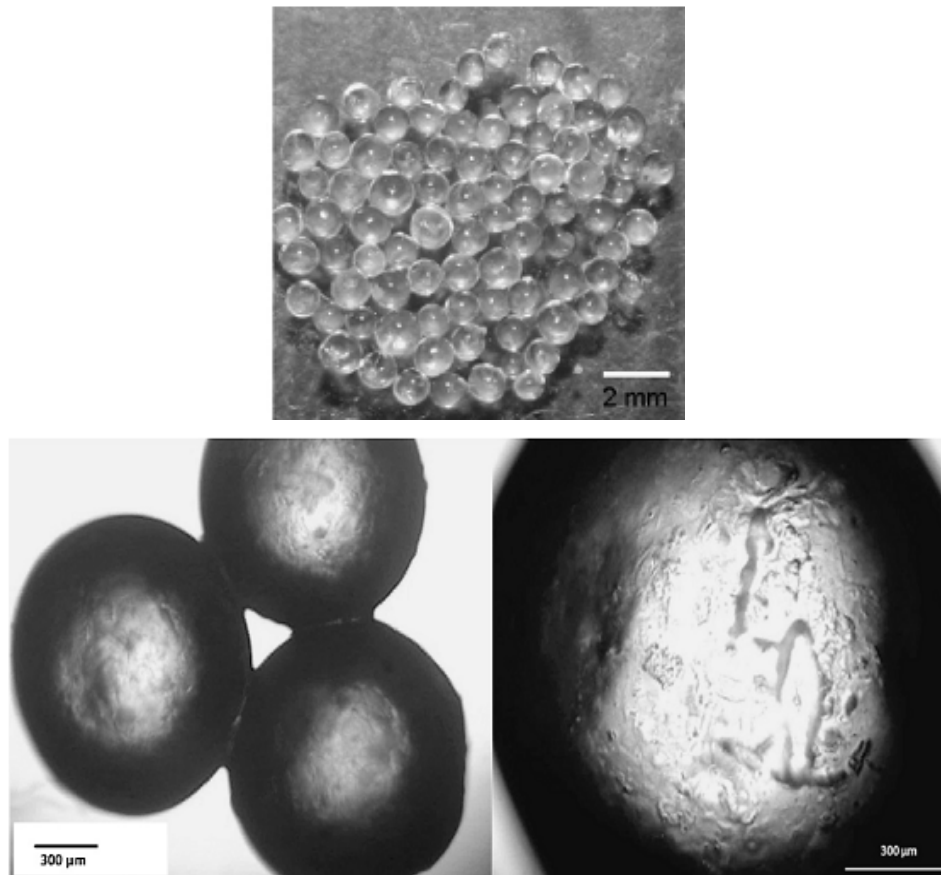


Figura 29 – Fotos da microscopia da lipase encapsulada com o núcleo líquido no meio rodeado por uma matriz de k-carragenina.

O encapsulamento da lipase mostrou bom pH, temperatura e armazenamento de estabilidade semelhante à lipase livre e conserva 72,3% de sua atividade original após utilizada para 6 ciclos. Pode ser armazenada por 10 dias em temperatura ambiente sem mudar sua atividade.

Rilling e seus colaboradores (1997) realizaram um estudo onde citocromo C foi utilizado como um modelo composto para estudar o comportamento das proteínas durante o processo de encapsulamento de microcápsulas de alginato e a perda por difusão durante o armazenamento. Esferas de gel de alginato foram revestidas com multicamadas de membrana constituídas por camadas alternadas de poli (N-vinilamina), poli (ácido acrílico) ou carboximetil celulose. Na prática da

imobilização de enzima duas dificuldades existem: durante a formação de esferas, normalmente ocorre uma sensível perda de enzima; e, durante a aplicação, algumas enzimas são perdidas por difusão na solução. Por este motivo se usa citocromo C para quantificar estes efeitos.

Utilizando a técnica de multicamadas, é possível produzir multicamadas com membranas de ajustável permeabilidade. Se as enzimas são imobilizadas com alginado, obtém-se melhores imobilização e rendimentos quando a concentração de sais na solução de gelificação é mantida tão baixo possível.

2.15– POLÍMEROS NATURAIS UTILIZADOS COMO SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO

Polímeros naturais têm sido utilizados para imobilização de enzimas em vários estudos (Murat, 1995). Polissacarídeos representam o grupo mais utilizado entre eles, por contribuir para que haja um aumento da biocompatibilidade entre suporte e biocatalisador, criando um micro-ambiente favorável e mantendo dessa forma, a atividade enzimática (Nascimento *et al.*, 2007).

Lee e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo modificando esferas de quitosana com diversos aminoácidos e selecionaram para a melhor atividade de imobilização a lipase, sendo preparada pela ativação da espinha dorsal da quitosana. Portanto, esferas de quitosana com propriedades diferentes poderiam ser facilmente preparadas por introdução de aminoácidos na sua espinha dorsal, considerando que os aminoácidos são materiais adequados para a preparação de esferas de quitosana modificada com o aumento da compatibilidade da lipase.

O processo de preparação é simples e econômico, e alguns aminoácidos são esperados para melhorar o desempenho catalítico da lipase imobilizada. A Figura 30 ilustra o esquema e modificação das esferas de quitosana com diversos aminoácidos

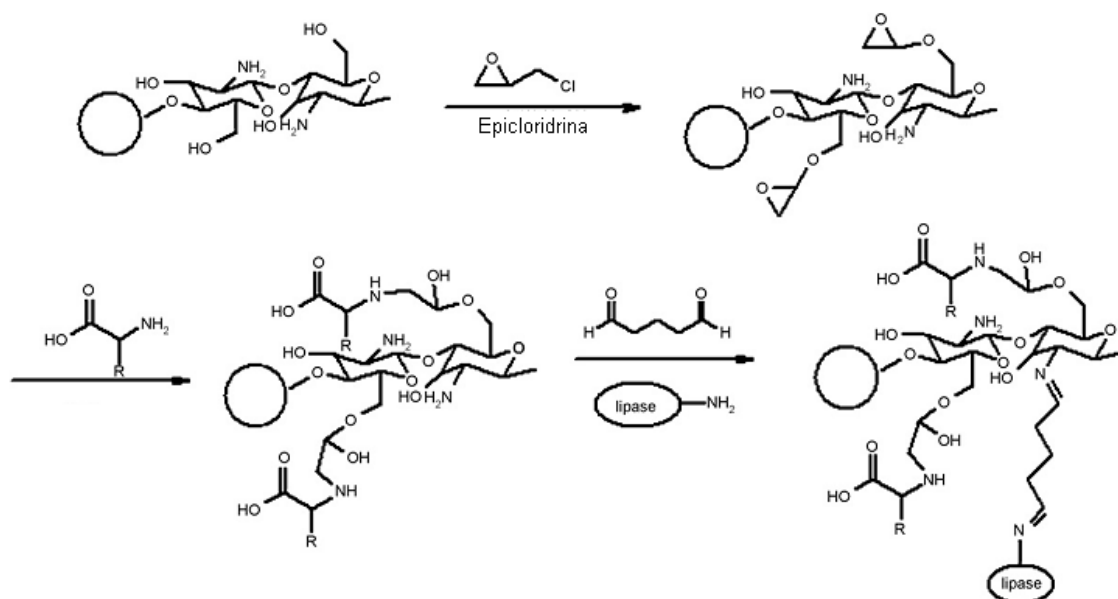


Figura 30 – Ilustração esquemática da preparação de aminoácidos modificando esferas de quitosana e imobilização de enzimas .

Huang e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo com microcápsulas 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. 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 podem ser muito melhoradas. A Figura 31 mostra a reação do grupo aldeído, próximo à superfície das esferas, interagindo com o grupo amino da enzima.

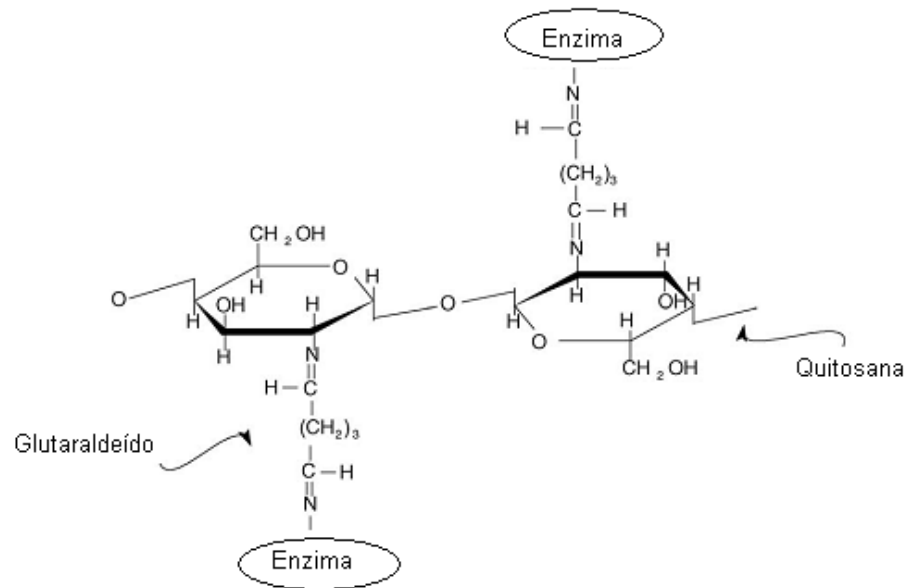


Figura 31 – Ilustração esquemática da imobilização da enzima em microcápsulas de quitosana por ligação cruzada com glutaraldeído.

A Figura 32 mostra a microscopia eletrônica de varredura do polímero natural quitosana e microcápsulas magnéticas de quitosana, sendo que as microcápsulas 82% tinham partículas de tamanhos de $3\mu\text{m}$ à $6.2\mu\text{m}$ 18% estavam na faixa de $6.2\mu\text{m}$ à $8.4\mu\text{m}$. No entanto a enzima imobilizada apresentou propriedades de estabilidade que melhoraram notavelmente.

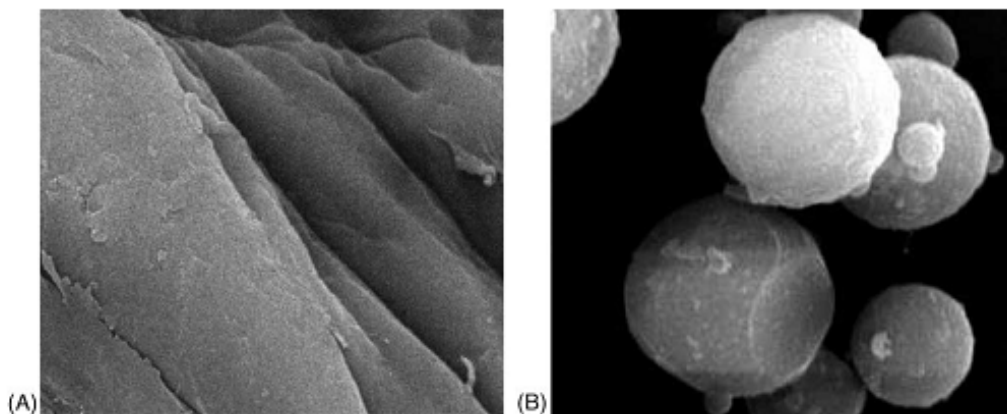


Figura 32 – Microscopia (A) quitosana natural, (B) microcápsulas magnéticas da quitosana (Huang et. al., 2005).

Gonçalves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo 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.

Cruz e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo imobilizando lipase de *Candida antarctica B* em esferas de quitosana para a produção de biodiesel por transesterificação de óleo de mamona. Tais enzimas vêm sendo intensamente investigadas na transesterificação de óleos e gorduras para a produção de biodiesel. No entanto, a aplicação das lipases, como de quaisquer enzimas na forma livre, torna-se inviável devido o fato de perderem atividade. Desta forma, para aumentar a vida útil das enzimas, as mesmas podem ser imobilizadas em suportes sólidos e dentre os vários suportes sólidos é possível destacar a quitosana.

O objetivo específico deste estudo era caracterizar e otimizar as condições de imobilização da lipase de *Candida Antarctica B* em esferas de quitosana ativadas com diferentes concentrações de glutaraldeído e promover os mesmos experimentos de caracterização para a lipase imobilizada comercialmente. Através do estudo da imobilização da lipase CALB L, constatou-se que a imobilização ocorreu de forma mais eficiente quando a solução enzimática foi incubada com esferas de quitosana ativadas com glutaraldeído 3% (v/v).

Wu e seus colaboradores atuaram na imobilização da lipase (2003) em esferas de quitosana utilizando amonioácidos e seus grupos hidroxila, através da imobilização binária. Por uma escolha adequada do processo de imobilização, os custos operacionais de processos industriais envolvendo lipases podem ser significativamente reduzidos. Através deste método de imobilização binária, a estabilidade térmica e a reutilização da lipase aumentaram consideravelmente.

Foresti e seus colaboradores (2007) realizaram um estudo utilizando as lipases *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens* e *Candida antarctica B* imobilizadas em quitosana em pó previamente tratada com solução aquosa de glutaraldeído com diferentes concentrações. A quitosana utilizada para este fim cumpre o requisito de ser um material de apoio, além de ser reconhecida pelas suas

excelentes propriedades para imobilização de enzimas, tais como, biocompatibilidade e biodegradabilidade.

A imobilização foi confirmada em microscopia e as atividades das nove lipases imobilizadas foram testadas. O estudo permite selecionar entre os catalisadores dois materiais que combinam alta atividade e seletividade: CA/CHIT e PF/CHIT/GLU 0,025. A Figura 33 mostra as microfotografias (a) quitosana em pó, (b) PF/CHIT/GLU 0,025, (c) CA/CHIT/GLU 0.025 e (d) CA/CHIT. A foto de (b) mostra um escasso aglomerado da lipase de cândida *Antarctica B*, já em (c) e (d) são claramente visíveis.

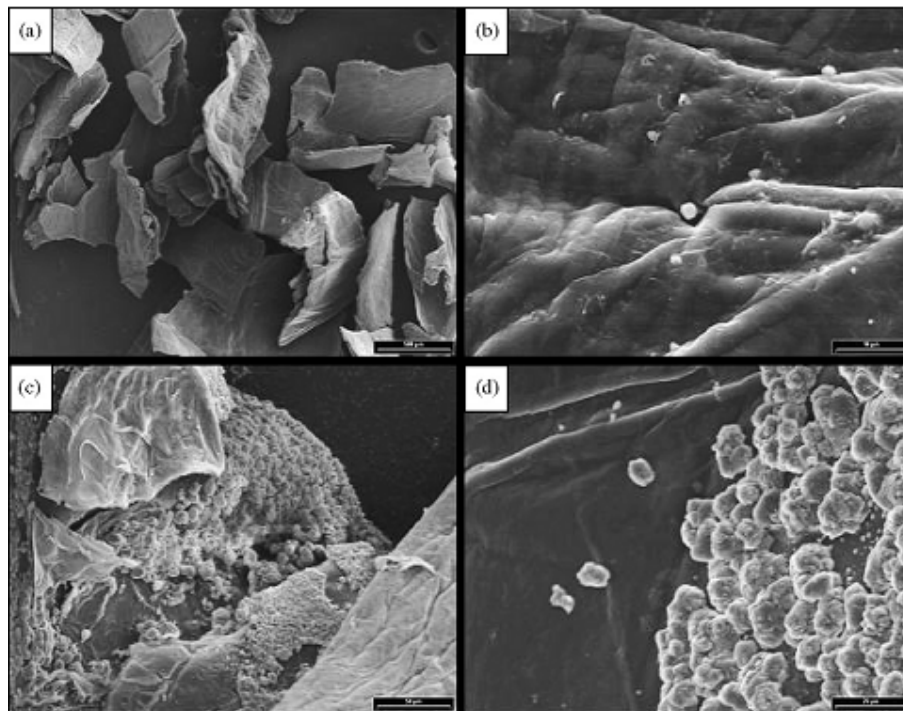


Figura 33 – Microscopia eletrônica quitosana em pó (40 x), (b) FP / QUIT / GLU 0,025 (x 2000), (c) CA / Chit / GLU 0,025 (400 x), e (d) CA / Chit (1000 x) (Foresti et. al., 2007).

Amiji e seus colaboradores (2004) realizaram um estudo preparando microcápsulas de alginato-quitosana a fim de desenvolver uma matriz biocompatível para a imobilização de enzimas. O entrecruzamento do núcleo de alginato foi uniformemente revestido com uma camada de quitosana. Este estudo ilustra um novo método de imobilização enzimática para aplicações biotecnológicas utilizando núcleos líquidos ou sólidos revestidos com uma microcápsula. A enzima é localizada e protegida no núcleo da matriz, enquanto a casca pode regular entrada e saída de substrato e produto.

A figura 34 mostra a micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana, pode ser visto que a mesma possui uma grande porosidade no núcleo.

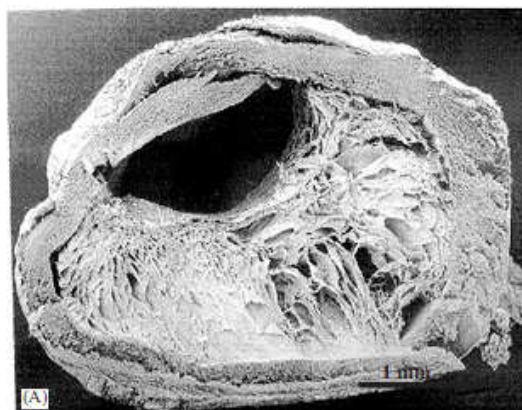


Figura 34 – Micrografia (MEV) da microcápsula de alginato-quitosana .

Murat (1995) realizou um estudo no qual a urease foi encapsulada em esferas xantana-alginato (XA), seguido por glutaraldeído (GA). As esferas retidas apresentaram alta atividade enzimática (75%), juntamente com boa estabilidade operacional, mesmo após 20 utilizações repetidas, e, assim, as esferas de GAXA podem ser utilizadas com sucesso em urease encapsulada por várias razões: encapsulamento com urease apresenta maior atividade enzimática através de pH e temperatura, quando comparado a sua forma livre; a esfera de GAXA pode ser facilmente preparada em polímeros naturais com baixo custo.

Xu e seus colaboradores (2005) realizaram um trabalho onde uma macromolécula natural, quitosana, foi entrelaçada à superfície de uma membrana de poli (acrilonitrila-co-ácido meleico) (PANCMA) para fabricar uma membrana de dupla camada de apoio a imobilização da enzima, já que a quitosana é considerada um apoio adequado para a imobilização. A lipase *Candida rugosa* foi imobilizada sobre esta dupla camada de membrana utilizando glutaraldeído (GA), sendo que o suporte utilizado para a imobilização da enzima é importante uma vez que sua interação com a enzima pode influenciar na estabilidade.

Wu e seus colaboradores (2003) realizaram um estudo onde criaram um novo conceito de imobilização de enzimas, tendo como suporte a quitosana contendo dois grupos hidroxilas ativados com carbodiimida para aumentar a quantidade de carregamento de enzima. O método de imobilização da lipase *Candida rugosa* a dois tipos de esferas de quitosana foi realizado ativando-se os grupos hidroxilas da quitosana com agente de acoplamento.

Minteer e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo sobre o efeito do grau de diacetilação sobre enzimas imobilizadas em quitosana modificada através da sua hidrofiliçidade. A quitosana é um polissacarídeo diacetilado formado da quitina que, ao longo da última década, tem sido empregada na modificação da hidrofiliçidade para induzir uma estrutura micelar. Estes polímeros micelares foram utilizados com várias finalidades, sendo uma a imobilização de enzimas. O estudo avalia o efeito que o grau de diacetilação tem sobre a modificação hidrofóbica e o peso molecular médio da quitosana e as conseqüentes alterações da atividade enzimática após a imobilização da glicose oxidase na estrutura micelar.

O trabalho demonstrou que as características físicas e as propriedades químicas da quitosana com a hidrofiliçidade modificada dependem do grau de diacetilação da quitosana.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – MATERIAIS

- Quitosana fornecida pela Sigma Aldrich, Brasil, com grau de desacetilação em torno de 80% e massa molar média igual a 161g/mol segundo o fabricante.
- Hidróxido de sódio (NaOH), fornecido pela VETEC.
- Tripolifosfato de pentasódio (TPF), VETEC fornecido pelo LCQUI/UENF.
- Polióxido etileno (PEO) de massa molar média igual a 1×10^5 g/mol, fornecido pela Sigma Aldrich.
- Copolímeros em bloco, poli(etileno-co-óxido de etileno), com 50 e 80% de PEO.
- Permanganato de potássio, fornecido pela VETEC
- Todos os solventes empregados são de grau PA.

3.2 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA

A modificação física de um polímero é comumente feita através da mistura física de dois ou mais polímeros, sem que haja ligação química entre eles. As blendas poliméricas são um tipo de mistura física sem ligação química.

A formulação de blendas poliméricas é muito interessante devido ao efeito cooperativo decorrente da mistura que resulta em melhoria das propriedades, em relação aos constituintes separados. Existem diversos processos de obtenção de blendas poliméricas, como citado na seção 2.9. Neste trabalho foi utilizado a técnica por evaporação do solvente (*casting*) .

3.2.1 – OBTENÇÃO DAS BLENDA POLIMÉRICAS

O método de formulação de blendas utilizado foi o de evaporação do solvente que consiste em espalhar a solução polimérica sobre uma superfície plana e então é permitida a evaporação total do solvente, um filme denso e homogêneo se forma.

3.2.1.1 - PREPARAÇÃO DA QUITOSANA

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas a partir da dissolução do material em solução aquosa de ácido acético a 1,0% (v/v). As soluções de quitosana foram mantidas sob agitação à temperatura ambiente por 24 horas. Após a dissolução do material, as soluções foram filtradas em placa de vidro sinterizado com tamanho de poro G1 (Merse), para a eliminação das impurezas insolúveis da quitosana. As soluções filtradas foram então desaeradas sob pressão reduzida.

Os filmes de quitosana com PEO, PE-b-80%-PEO, PE-b-50%-PEO e PE-b-PEO-COOH, foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e polímeros em relação (QUITOSANA/ Polímero) de 80/20. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

A silanização das placas utilizadas como moldes foi efetuada utilizando-se óleo de silicone aplicado com papel absorvente, de modo a recobrir uniformemente a superfície interna das placas, que foram então mantidas em estufa por duas horas a 200°C. As placas foram cuidadosamente lavadas com uma esponja macia umedecida com água e detergente (comercial) e imersas em água corrente por dois minutos. Após este procedimento, as placas permaneceram imersas em água destilada por 12 horas, sendo secas à temperatura ambiente antes de seu uso.

As soluções de quitosana ou quitosana/polímero foram vertidas nas placas de Petri, estas foram mantidas em dessecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M

por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

As membranas produzidas foram secas à temperatura ambiente sob prensagem entre duas folhas de papel de filtro, sendo, então, envoltas em papel vegetal e armazenadas à temperatura ambiente.

3.2.2 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLIÓXIDO ETLILENO

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas de acordo com metodologia citada anteriormente.

Os filmes de quitosana com PEO foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e PEO em relação (Q/ PEO) de 80/20. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

As soluções de quitosana ou quitosana/polímero foram vertidas nas placas de Petri silanizadas e, estas foram mantidas em dissecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

3.2.3 – PREPARAÇÃO DE FILMES DE QUITOSANA COM POLI(ETILENO - *co* - ÓXIDO ETILENO) E POLI(ETILENO - *co* - ÓXIDO ETILENO) MODIFICADO.

Soluções de quitosana de 1,0 (m/m) foram preparadas de acordo com metodologia citada anteriormente.

Os filmes de quitosana com PE-b-80%PEO, PE-b-50%PEO e PE-b-80%PEO-COOH previamente obtido por oxidação em meio básico do PE-b-80%PEO (Fontineles, 2006) foram preparados pela mistura das soluções filtradas de quitosana e PE-b-80%PEO e PE-b-50%PEO em relação (Q/ Copolímero) de 80/20 m/m. A mistura foi feita sob agitação para a completa homogeneização do sistema.

As soluções de quitosana ou quitosana/copolímero foram vertidas nas placas de Petri previamente silanizadas e, estas foram mantidas em dissecador sob pressão reduzida por três horas para eliminação das bolhas de ar.

Após a desaeração, as amostras foram mantidas em estufa com circulação de ar à temperatura de 50°C até a obtenção de massa constante. Após a secagem, as membranas densas foram imersas em uma solução de hidróxido de sódio a 1 M por 24 horas à temperatura ambiente visando, desta forma, a neutralização do ácido acético residual. Após a neutralização, as membranas foram exaustivamente lavadas com água destilada (aproximadamente 2 litros por membrana) para a remoção do excesso de base ainda presente.

3.3 – MÉTODOS DE CARACTERIZAÇÃO DOS FILMES DE QUITOSANA E BLENDAS

3.3.1 - CARACTERIZAÇÃO POR FTIV

Uma molécula pode absorver energia proveniente de radiação eletromagnética, sofrendo vários tipos de excitação como eletrônica, rotacional, mudança de *spin* e deformação de ligação, entre outras. A espectroscopia no infravermelho refere-se à radiação de excitação a números de onda entre 4000 e 600 cm^{-1} . A diferença de intensidade entre o feixe de referência e a do feixe transmitido mede a quantidade de radiação absorvida. Os números de onda de absorção relativos aos modos de vibração dependem da força da ligação química entre dois átomos, e a intensidade de absorção da diferença do momento dipolar nesta mesma ligação. Desta forma, é possível caracterizar a função química a qual pertence o composto.

A matéria é capaz de interagir com a energia proveniente da radiação eletromagnética, sofrendo vários tipos de excitação como eletrônica, rotacional, mudança de *spin* e deformação de ligação, entre outros.

A espectroscopia no infravermelho investiga a interação da radiação eletromagnética na região do infravermelho com a matéria. O FTIV será realizado no equipamento VARIAN 3100 FT-IR SCALIBUR SÉRIES disponível na Unidade de Caracterização Térmica do Instituto de Macromoléculas Eloisa Mano do Centro de Tecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

As amostras analisadas estão sob a forma de filmes. Os espectros serão obtidos em um intervalo de 4500 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4.0 cm^{-1} e 20 acumulações por espectro.

3.3.2 - MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

O microscópio de força atômica permite ao usuário superar a limitação que a microscopia de tunelamento impõe em relação a amostras não condutoras. Também é possível analisar amostras em ambientes úmidos. Uma ponta de prova é posicionada em uma haste de material macio, que varre a amostra analisada. Um feixe laser incide sobre a parte posterior da haste e, após sofrer reflexão, é defletido em um fotodiodo com dois setores.

A diferença de intensidade da luz que alcança os dois setores é uma medida da deflexão do suporte e fornece um sinal que é enviado ao circuito eletrônico. A deflexão é então mantida constante durante a varredura. A varredura é feita com força constante entre a amostra e o suporte. A medida da força de arraste da ponta de prova sobre o substrato pode ser associada, por exemplo, com a força de adesão de células ao substrato. A aproximação da ponta à superfície analisada é menos delicada já que a ponta é suportada por um material macio e evitará dano à amostra (DESCOUTS *et al*, 1995).

As imagens foram obtidas em um AFM Multimode Nanoscope III scanning probe microscope Veeco Instruments, em atmosfera ambiente e temperatura controlada (21°C), usando modo contato intermitente. Será usada uma resolução de 256x256 linhas e scanner AS-12 ("E") de área de varredura de 10 x 10 µm e faixa vertical de 2,5 µm. Foram usados cantilever de fósforo dopado com silício de frequência de ressonância de 235-295 KHz, constante de mola de 20 a 80 N/m.

O modo contato intermitente permite obter imagens de superfícies mais irregulares como o caso da maioria dos materiais poliméricos o que não é permitido com o modo contato em que há uma aproximação muito grande entre sonda e amostra. Neste modo de análise a frequência de varredura será inferior a 1 Hz para garantir um bom sinal, capaz de gerar uma imagem superficial adequada do material analisado.

A rugosidade dos filmes foram medidas a partir das análises de AFM, a determinação da rugosidade de superfícies tem sido feita através das análises de microscopia de força atômica quando operado em modo de contato intermitente. As diferenças relativas à morfologia da superfície dos filmes foi avaliada através de três parâmetros de rugosidade. Esses foram, à diferença entre o ponto mais alto e mais

baixo para uma dada área, simbolizada pela letra z ; o desvio padrão do valor de z (R_q) para a área superficial analisada; e a rugosidade média (R_a) que representa o valor médio das alturas da superfície, relativas a um plano central que divide a mesma em duas porções de igual volume.

Na Figura 35a temos de forma ilustrativa o modo de varredura da ponta pela superfície, na Figura 35b a imagem gerada da superfície de uma amostra, além de um quadrado com comprimento lateral L , que representa a área que esta sendo analisada e na Figura 35c o perfil da linha destacada na Figura II.5b.

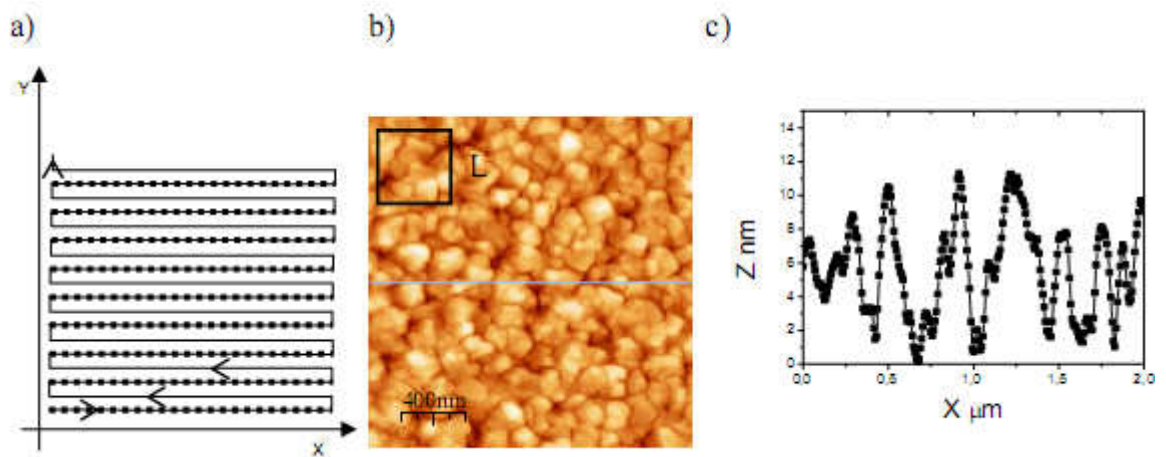


Figura 35- Esquema ilustrativo do modo de varredura do AFM para a obtenção dos parâmetros de rugosidade

O desvio padrão (R_q) é determinado através da Equação 8.

$$R_q = \sqrt{\frac{\sum (z_i - z_m)^2}{N_p}} \quad (8)$$

Onde z_i é a altura no ponto i , N_p o número de pontos, z_m é a média das alturas. A rugosidade média (R_a) é determinada através da Equação 9.

$$R_a = \frac{1}{L_x L_y} \int_0^L \int_0^L |f(x, y)| dx dy \quad (9)$$

Onde $f(x, y)$ é o perfil superficial relativo ao plano central, e L_x e L_y são as dimensões da superfície nas direções x e y , respectivamente (Khayet *et al.*, 2004).

As medidas de rugosidade foram feitas pelo programa de computador NanoScope (R) III, fornecido pela fabricante do AFM utilizado nas análises. A área da superfície dos filmes avaliados foi de $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$, sem tratamento prévio da imagem.

3.3.3 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

Nessa técnica, um feixe colimado de elétrons varre a superfície da amostra. Os elétrons espalhados são coletados, gerando um sinal que é amplificado e usado para modular o brilho de um tubo de raios catódicos que é varrido simultaneamente ao feixe de elétrons. A imagem gerada é uma imagem ponto a ponto. Como a profundidade de campo é muito grande, essa técnica é muito utilizada em estudos topográficos.

Vários tipos de contrastes podem ser utilizados de acordo com a finalidade da análise. Na análise com contraste por elétrons secundários, são captados elétrons com baixa energia, oriundos da superfície da amostra. Essa particularidade permite a análise de detalhes retro espalhados, são coletados elétrons de maior energia, oriundos de uma profundidade maior da amostra. Esse contraste é fortemente dependente das espécies atômicas envolvidas. Isso faz com que essa técnica seja potencialmente usada na identificação de fases que não apresentam significantes diferenças morfológicas.

3.3.4- ANÁLISE DE PERMEABILIDADE POR GRAVIMETRIA

Sorção e difusão de gases e vapores orgânicos em polímeros têm grande importância tecnológica. Uma análise cuidadosa das propriedades de transporte pode tornar mais claros aspectos estruturais dos polímeros, sendo estes influenciados pela natureza do polímero, morfologia, natureza e densidade de ligações cruzadas, cristalinidade, tamanho da molécula do permeante, temperatura de preparação de amostras, entre outros fatores (Poley e *colab.*, 2005).

Em resumo, a permeabilidade pode ser definida como a quantidade de permeante atravessando um filme polimérico de espessura unitária, por unidade de área, por unidade de tempo e a uma determinada pressão de vapor. Sua unidade comumente encontrada na literatura é o Barrer: 10^{-10} [cm^3 (STP) $\text{cm cm}^{-2} \text{s cm Hg}^{-1}$] (Galego e *colab.*, 2002).

No caso de experimentos de permeação, um gás é introduzido em um dos lados da membrana a pressão constante. Considerando a magnitude das pressões, supõe-se que a pressão do outro lado da membrana é zero.

O equipamento utilizado é o *Halogen Moisture Analyzer* modelo *HR73* da *Mettler Toledo*. Este equipamento baseia-se na medida da perda de massa do solvente permeado através da membrana.

São utilizados para o experimento os seguintes materiais: anel de teflon, anel de borracha, lacre de alumínio e um frasco de vidro pequeno específico. O anel de teflon não permite o contato entre a membrana (filme polimérico) e o lacre de alumínio. O anel de borracha é colocado entre a membrana e o frasco, auxiliando o lacre de alumínio na vedação do sistema. (Figura 36)

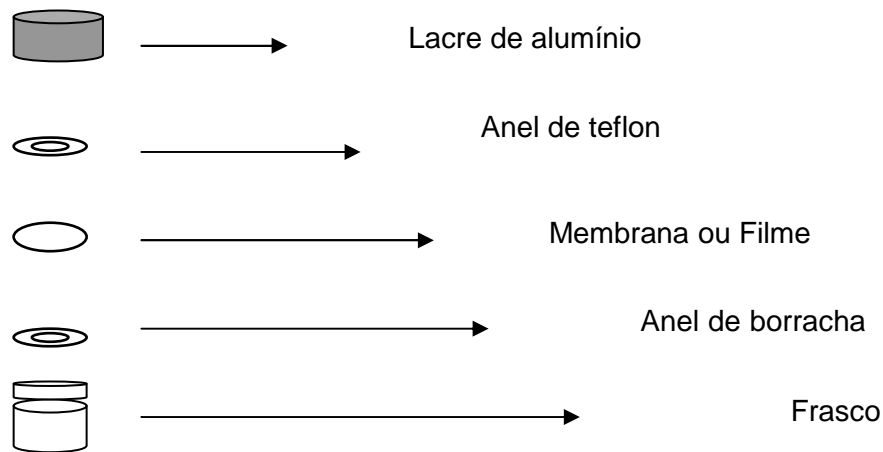


Figura 36 - Sistema tipo "copo de Payne" utilizado para medidas de transporte de massa.

A permeabilidade depende de um termo cinético relativo à difusão das moléculas através do filme e outro termodinâmico, relacionado ao calor de adsorção que influi na solubilidade das moléculas do permeante no polímero

A solubilidade depende da absorção das moléculas do permeante pelo polímero. A absorção aumenta com o aumento da interação entre o polímero e o permeante.

Os experimentos foram realizados utilizando-se água a uma temperatura de ensaio de 50°C, 55°C e 60°C. O coeficiente de permeabilidade foi determinado pela Equação (10).

$$\frac{Ql}{P_V A} = TDH \left(t - \frac{l^2}{6D} \right) \quad (10)$$

A equação foi adequadamente adaptada para trabalhar com vapor de água. Neste cálculo, deve-se considerar também a temperatura do ambiente, além da temperatura na qual a balança estabiliza o sistema (já considerada), e a umidade relativa do ambiente.

$$P = \frac{Ql}{A(R_1 - R_2)P_V} \quad (11)$$

Onde:

Q – coeficiente angular do ajuste linear do gráfico de permeabilidade;

L – espessura da membrana;

A – área da membrana;

R₁ – umidade no interior do sistema (copo de Payne);

R₂ – umidade no ambiente externo ao sistema;

P_v – pressão de vapor da água na temperatura do ambiente.

Uma informação importante que se pode obter através do coeficiente de permeabilidade é a energia de ativação, que pode ser obtida através do gráfico de log(P) versus 1/T, no gráfico a energia de ativação pode ser obtida a partir do coeficiente angular da reta de ajuste linear. (Poley, 2005)

3.3.5 - CARACTERIZAÇÃO POR ANÁLISE DINÂMICO-MECÂNICA

O grau de miscibilidade da região amorfa das blendas formuladas será avaliado através do comportamento termo-mecânico através da técnica de análise dinâmico-mecânica (DMA). A análise de DMA mede de forma separada o comportamento mecânico sob o efeito de tempo e temperatura da fase cristalina e amorfa do polímero (Lucas *et al*, 2001). Este ensaio permite a determinação da temperatura de relaxação da transição vítrea do polímero devido à análise em separado das modificações microscópicas da fase amorfa.

As propriedades dinâmico-mecânicas de materiais são definidas a partir do comportamento do material frente a deformação ou à aplicação de tensão oscilatória de pequena amplitude. Normalmente submete-se o material à uma deformação senoidal. Se o comportamento visco elástico é linear, material responderá à deformação com uma tensão também senoidal, porém defasada de um ângulo δ em relação à deformação devido à dissipação de energia.

Das misturas obtidas, a caracterização do grau de miscibilidade pela fase amorfa, será realizada através de corpos de prova retangulares com dimensões de 22,5 x 8,2 x 0,21 mm ($\pm 10\%$). A mesma análise será realizada também com os filmes de 100%CH. As análises serão realizadas em um TA Instruments DMA 2980 multi-freqüência, com *clamp* tipo garra, freqüência de 1 Hz, taxa de aquecimento de 4°C/min, na faixa de temperatura de -90 a 100°C, utilizando nitrogênio como gás de resfriamento na unidade de caracterização térmica e de superfícies do SEPOL/LAMAV/UENF

3.3.6 – CARACTERIZAÇÃO POR DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Desde que os raios X são de natureza eletromagnética, eles devem ser difratados em planos cristalinos se a distância entre os planos for comparável ao comprimento de onda dos raios X. Em cristais, os quais possuem ordem tridimensional, o arranjo dos planos na rede faz com que a difração ocorra. Os raios emitidos de diferentes planos cristalinos interagem sistematicamente entre si, fornecendo reflexões discretas. De acordo com Bragg, a posição da reflexão é dada pelo comprimento de onda λ do feixe de raios X incidente, pela distância d entre os planos paralelos e pelo ângulo θ entre o raio incidente e o plano da rede ou seja:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (12)$$

em que n é a ordem da reflexão. Em polímeros, a reflexão de maior intensidade é comumente encontrada para $n = 1$. Se os planos dos diferentes cristalitos são aleatoriamente distribuídos uns em relação os outros (como em pós-cristalitos), então o raio monocromático encontrará partículas suficiente para produzir todas as posições de reflexões que preenchem as condições de Bragg. Desde que haja

muitos cristalites pequenos com diferentes orientações de planos cristalinos, será obtido em sistema de cones coaxiais de raios X com um vértice no centro da amostra. Uma seção vertical deste sistema de cones sobre um plano fotográfico fornece uma série de currículos concêntricos, ou setores de currículo, no caso de um filma cilíndrico.

Polímeros amorfos expostos aos raios X apresentam sobre uma placa fotográfica anéis fracos sobre um *background* forte e difuso. Esses máximos fracos também denominados de halos são originários de uma “ordem” local em polímeros amorfos. Polímeros parcialmente cristalinos também mostram estes halos, mas, em adição mostram em anéis fortes de reflexões cristalinas.

A origem do *background* difuso é devida, principalmente ao espalhamento do ar, com contribuições pequenas do movimento térmico nos cristalites, e ao espalhamento Compton. O espalhamento Compton é um efeito de espalhamento incoerente e quantizado que ocorre igualmente em todas as substâncias independentemente de seu estado físico.

A intensidade das reflexões e dos halos geralmente é interpretada de acordo com um modelo de duas fases, como por exemplo, o conteúdo das fases cristalinas amorfas. Para efetuar essa análise deve-se subtrair a intensidade do *background* difuso

Em análises de raios X, podem-se utilizar vários tipos de detectores sensíveis, como, por exemplo, um contador proporcional. Este sistema detecta e conta os fótons de raios X separados em um feixe difratado. Com este método, registra-se a intensidade versus o ângulo 2θ diretamente.

Cada um dos métodos (fotográfico e difratométrico) tem suas vantagens e desvantagens. A técnica fotográfica registra de uma só vez o padrão inteiro de difração e é excelente para localizar inicialmente máximos de difração, mas é ruim na produção de dados quantitativos, devido a problemas relacionados à leitura fotométrica dos dados. Já o contador difratométrico fornece resultados quantitativo diretamente, mas pode ocorrer perda de pontos de difração, o que permitiria o estabelecimento das condições adequadas para a obtenção do difratograma.

Para o estudo de materiais poliméricos por difração de raio X, há duas regiões de interesse, são elas:

1 – A região dos altos ângulos, que corresponde aos ângulos 2θ de Bragg até 30° - 50° .

2 – A região dos baixos ângulos, que corresponde aos ângulos 2θ de Bragg até 1° .

Os resultados que podemos obter a partir das técnicas de raios X de alto ângulo são:

1 – *Quantidades relativas das fases cristalina e amorfa no polímero*: para determinar o conteúdo amorfo, inicia-se a análise a partir do ângulo mais baixo de espalhamento, uma vez que as reflexões cristalinas são quase ausentes nesta região. Por outro lado, a difração cristalina apresenta normalmente um mínimo (intensidade máxima) entre dois máximos, se estes estiverem separados por mais de 3° . Para a análise, assume-se que a intensidade difratada é proporcional ao conteúdo cristalino e que a intensidade dos halos amorfos é proporcional ao conteúdo amorfo (em um ângulo ou uma faixa de ângulos específicos). Os fatores de proporcionalidade dependem também do ângulo de observação e de uma função específica. Estes podem ser determinados, por exemplo pela comparação com amostras completamente cristalinas ou amorfas. Amostras amorfas podem ser obtidas pelo resfriamento rápido (nem sempre possível) do polímero fundido ou pelo estudo direto por raios X da amostra no estado fundido. A intensidade das reflexões será, então, uma medida da cristalinidade.

2- *Tamanho e perfeição dos cristais*: à medida que os cristais expostos aos raios X se tornam menores ou menos perfeitos, os picos difratados ou as linhas tornam-se mais largos. Infelizmente, em muitos casos, não é possível diferenciar as duas causas de alargamento de linha ou pico em amostras poliméricas, a menos que duas ou mais ordens de reflexão (de planos com índices de Miller (110) e (220), por exemplo) possam ser observadas. Na ausência de ordens múltiplas, é praticamente impossível identificar a origem do alargamento dos picos, a menos que outra informação ajude a tomar a decisão correta. Além disso, os cristais devem estar presentes acima de uma certa concentração mínima, caso contrário, a intensidade da reflexão correspondente não será obtida por este método.

Para obter difrações de raios X discretas, é necessário, ainda que se tenham concentrações suficientemente altas de regiões ordenadas bidimensionais e que estas se estendam por distâncias de, pelo menos, 2 a 3 nm. Este fato torna suspeito o cálculo do tamanho dos cristais a partir a largura das reflexões para macromoléculas. As posições das unidades monoméricas de cadeias individuais são, de fato, levemente deslocadas umas em relações às outras na cristalização por

razões cinéticas, isto é, partes da cadeia são fixadas em estados de ordem antes que toda a cadeia adquira a posição ideal na rede.

Portanto, este efeito provoca variações locais na constante da rede que por sua vez, podem promover o alargamento dos picos.

3 – *Orientação*: quando uma amostra se torna cada vez mais orientada, os anéis de difração dos raios X se transformam em arcos, os quais podem se tornar cada vez mais estreitos e se apresentar na forma de pontos. Como resultado da orientação tanto em filmes como em fibras, temos que o eixo molecular é alinhado paralelamente à direção do estiramento (chamado meridiano) e o equador corresponde à direção perpendicular a ela. O cálculo da orientação cristalina é bastante complexo.

4 – *Ordem de empacotamento*: as reflexões equatoriais em um diagrama fornecem informação a respeito do empacotamento entre as cadeias, da regularidade e da ordem lateral de longo alcance no cristal, além da simetria da célula unitária.

Os filmes obtidos a partir das blendas de quitosana, foram estudados pela técnica de difração de Raios X a partir da deposição do filme no porta amostra utilizando difratômetro marca SHIMADZU modelo XRD 7000 (Figura 37). Os dados de difração foram coletados de 5° a 40° (2θ), sendo utilizados com os seguintes parâmetros de medida de tensão de 40 kV, corrente no filamento de 30mA, foi usada radiação de cobre, com velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$.



Figura 37 - Difratômetro marca Shimadzu modelo XRD 7000, utilizado para as análises.

3.3.7 – CARACTERIZAÇÃO POR ESPECTROSCOPIA FOTOACÚSTICA

Neste trabalho, foram utilizadas as técnicas fotoacústicas como parte da caracterização das propriedades térmicas das blendas em colaboração com o grupo de pesquisa “Fenômenos Fototérmicos” do Laboratório de Ciências Físicas (LCFIS) da própria Universidade (UENF).

A técnica fotoacústica pertence a uma família de técnicas fundamentadas no chamado efeito fototérmico. Este efeito consiste na medida da flutuação da temperatura de um meio devido a absorção de energia radiante modulada. A variação de temperatura da amostra é detectada indiretamente por meio de um microfone de eletreto.

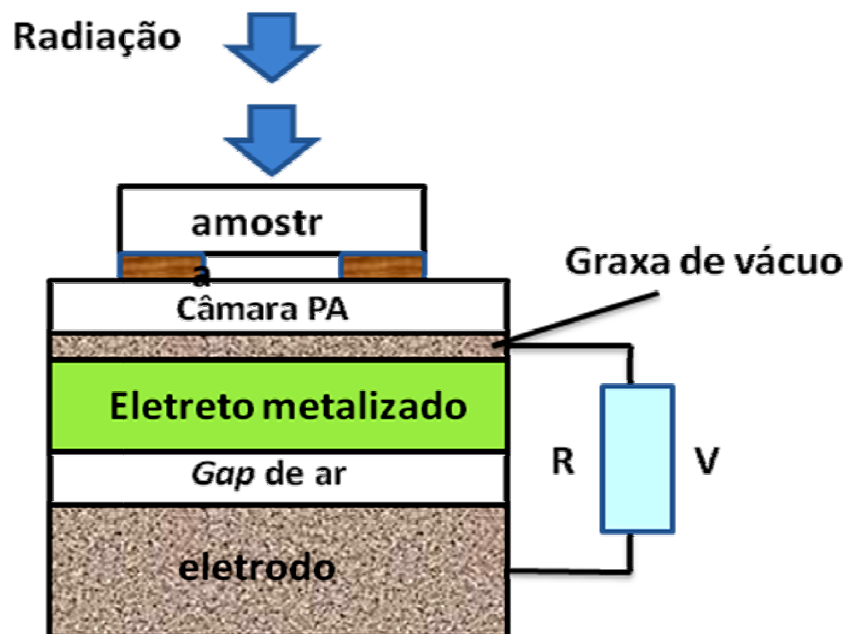


Figura 38 - Esquema do microfone de eletreto.

De uma forma geral existem três mecanismos de geração de sinal acústico: difusão, expansão e termoelástico.

- *Mecanismo de difusão:*

A energia térmica gerada na superfície exposta à incidência de uma radiação luminosa modulada se difunde pela amostra até atingir a superfície oposta que está voltada para o interior do microfone. Ao atingir esse lado da amostra o calor é transferido, em forma de energia cinética, para as moléculas contidas no volume delimitado pela amostra e o microfone, aumento modulado da energia cinética, representa um aumento modulado da pressão dentro desse volume, (som). (Figura 38)

- Mecanismo de Expansão:

A expansão e contração volumétrica da amostra devido ao acúmulo de energia térmica gerado pela incidência de uma luz modulada e pode resultar numa alteração do volume da câmara fotoacústica.

- Mecanismo Termoelástico:

Dependendo do tipo de material a ser caracterizado (baixa difusividade térmica), ocorre um gradiente de temperatura na direção z. Tal gradiente é responsável por uma expansão maior da amostra no lado voltado para incidência de luz em relação ao lado que está fixo no microfone. Assim, uma vez que a luz incidente está modulada, ocorre a deflexão elástica periódica da amostra sobre o microfone e assim a geração do sinal acústico. Esse é o mecanismo predominante em materiais poliméricos.

3.4 – FORMULAÇÃO DE MATRIZES COM ESTRUTURA CASCA - NÚCLEO

3.4.1 – PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOMAGNETITA (NÚCLEO)

Para a preparação das microcápsulas de magnetita (Fe_3O_4), foi empregado método de co precipitação (Yang et al.,2008). No reator, foi colocados 50 mL de cada uma das soluções aquosas de sais de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,5M e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,75 M) acrescidos de 50 mL de água também deionizada, resultando num volume total de 150mL.

Sob atmosfera de nitrogênio e temperatura de 60°C, serão adicionados 13 mL de uma solução aquosa de hidróxido de amônia 28% w/w. Após a adição, deve-se observar a mudança de cor para uma coloração escura.

O precipitado foi isolado por decantação magnética e lavado 3 vezes com água destilada para eliminar o excesso de NH_3 . Por fim, as microcápsulas foram secas à temperatura ambiente e vácuo e, após macerar e peneirar (100mesh), as mesmas serão caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) utilizando o equipamento Shimadzu, modelo SSX-550, disponível no LAMAV/CCT, para a análise morfológica das microcápsulas magnéticas.

3.4.2 – PREPARAÇÃO DE MICROCÁPSULAS POLIMÉRICAS COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS PELA TÉCNICA DE *SPRAY-DRYING*.

Várias técnicas de microencapsulamento são descritas na literatura. Grande parte delas são baseadas no uso de solventes orgânicos para preparação das microcápsulas, tais como separação de fase orgânica, secagem a jato *spray drying*, evaporação de solvente.(Breitenbach et al, 2000)

O *spray drying* é a técnica mais utilizada nas indústrias química (plásticos, cerâmicos, fertilizantes e pigmentos), alimentação (leite em pó) e farmacêutica (extratos de plantas, materiais naturais e excipientes). O objetivo desta técnica é obter um produto seco, mais concentrado e de fácil conservação ou de manuseio do que os processos de extração de soluções. Pode-se assumir que a secagem quase instantânea do produto evitará ao máximo sua hidrólise, oxidação e sua decomposição.

A preparação de microcápsulas por *spray drying* oferece uma série de vantagens: menor dependência da solubilidade do agente ativo do que os métodos de evaporação do solvente, as condições de processamento são mais suaves e adequadas para a formulação de microcápsulas carregadas com proteínas e peptídeos, é um processo contínuo de fácil alimentação e de maneira gradual.

Na técnica de *spray drying*, um líquido na forma de *spray* é secado e coletado, sendo o resíduo o produto final. A técnica de *spray drying* é utilizada em várias indústrias, tais como na indústria de alimentos e farmacêutica na produção de materiais plásticos e cerâmicos. Ela é adequada para materiais que sejam sensíveis ao calor, devido ao processo de secagem ser rápido o material não precisa ser submetido a altas temperaturas para concluir a secagem dentro de um tempo razoável.

O processo de *spray drying* pode ser dividido em três etapas:

- Atomização do líquido por um redemoinho, pressão ou atomizador pneumático e entradas deste em câmara de secagem.
- Secagem das gotas do *spray* por um fluxo de gases aquecidos, produzindo um resíduo na forma de pó.
- Remoção do pó do meio de secagem, usualmente por meio de um separador ciclone.

A Figura 39 mostra o diagrama de blocos para o processo de pulverização das microcápsulas pela técnica de *spray drying*.

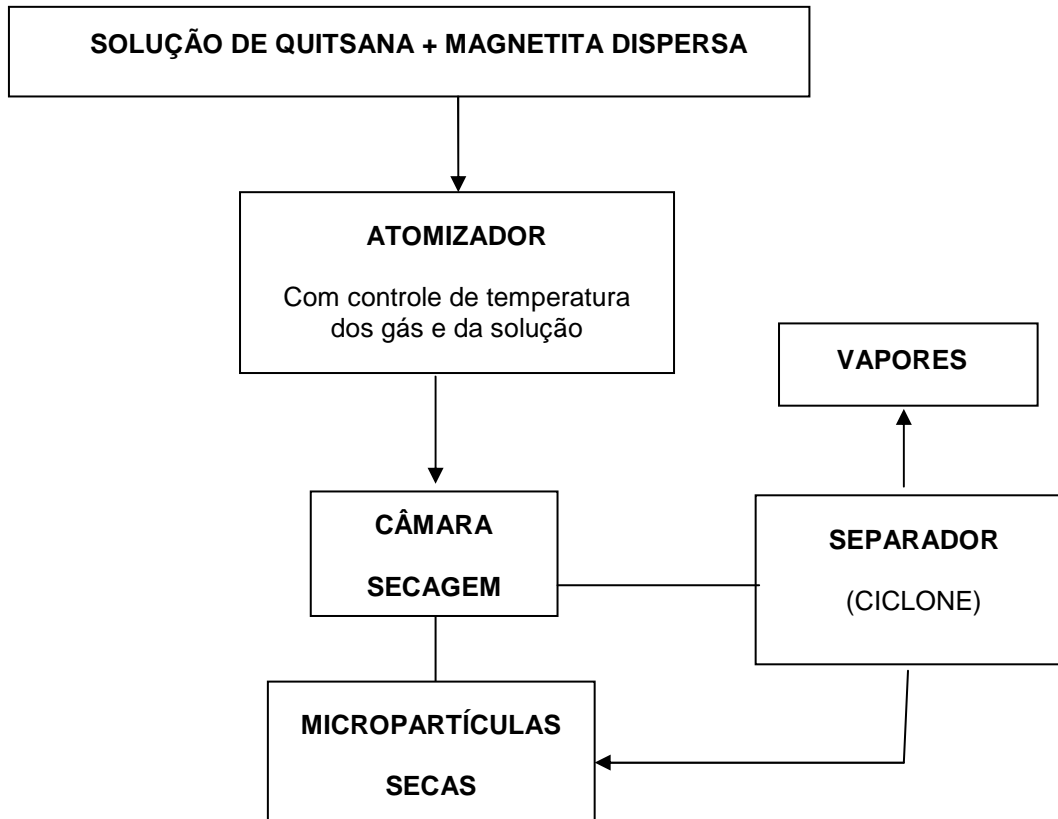


Figura 39 - Processo para formulação das microcápsulas pela técnica de secagem por pulverização (*spray drying*).

As microcápsulas foram obtidas utilizando o equipamento SD-04 *Laboratory Scale Spray Drier*, disponível no setor de polímeros (SEPOL).

3.5 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS DE QUITOSANA COM O NÚCLEO DE NANO-MAGNETITA

3.5.1 – MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

As micrografias de varredura foram obtidas num microscópio eletrônico de varredura (MEV) Shimadzu SSX-550, disponível no LAMAV/CCT para a nanomagnetita sintetizada e para as microcápsulas formuladas para determinar sua morfologia e tamanho das partículas. As microcápsulas foram depositadas num porta-amostra com fita adesiva de grafite e recobertas com um filme de ouro de 20 nm para não sofrerem descargas durante a análise.

3.5.2 – 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 μ g, nos termopares de platina de 0,001 $^{\circ}$ C, disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL).

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

O gás hélio foi 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 N₂, 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.

3.5.2 – POROSIDADE

As microcápsulas foram testadas com objetivo de caracterizar a porosidade. Para a quitosana e outros biopolímeros, a porosidade pode ser influenciada pelos seguintes fatores: a rota de preparação e as modificações químicas. Na etapa de preparação, os parâmetros mais importantes foram a concentração da solução de quitosana e a concentração da solução de NaOH (Beppu e Santana, 1999). Com objetivo de maximizar os valores de porosidade, foram usados altos valores de concentração, aproximadamente 2,0 %, em massa, de quitosana e 1 M de NaOH.

O nome BET, da técnica de adsorção de gás, foi designado em homenagem aos três pesquisadores que desenvolveram a teoria de adsorção de gás para efetuarem medidas de área superficial específica Brunauer, Emmett e Teller, que trabalharam com a isoterma de adsorção de multicamadas de gás de forma similar a Langmuir, que equacionou a monocamada adsorvida. A isoterma é a relação entre a quantidade de gás adsorvido e a pressão do gás a certa temperatura.

A adsorção de gás ocorre em qualquer sólido, sendo dependente da temperatura, pressão e superfície. A adsorção física dos gases é promovida por forças do tipo Van der Waals. O equilíbrio da adsorção física do gás é rápido, pois não envolve energia de ativação e é um processo reversível.

Para a realização das medidas para as microcápsulas formuladas foi utilizado o equipamento de adsorção de gás Autosorb-1 da Quantachrome Instruments pertencente ao LCQUI/UENF.

Para a análise, o material foi secado em estufa (para retirada de umidade) e pesado para que, assim, possa ser colocado no portas-amostra, que será acoplado ao equipamento. Será realizado um pré-tratamento a 90°C por 24h para posteriormente, realização das medidas de área superficial específica e de porosidade.

A área superficial total das amostras submetidas a esta análise foi calculada pelo equipamento através do nitrogênio adsorvido (m^2), a partir do volume de gás adsorvido (V) em função da pressão relativa (P/P_0). A área superficial foi medida e dividida pelo peso total da amostra testada (g), a fim de se obter a área superficial específica ($m^2 \cdot g^{-1}$).

3.5.3 – MEDIDAS DAS PROPRIEDADES MAGNÉTICAS – MAGNETÔMETRO DE AMOSTRA VIBRANTE

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 (Bordini, 2006)

As propriedades magnéticas foram estudadas utilizando um magnetômetro Vibrational OXFORD VSM, Modelo 3001(Figura 40) com um campo magnético com eletroímã máximo de 1,6 Tesla e sensibilidade de 10^{-5} emu, que serão realizados no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), todos serão realizados em temperatura ambiente, usando um campo externo de 2 KOe para varrer o campo na origem da curva inicial de magnetização.



Figura 40 - Magnetômetro de Amostra Vibrante marca OXFORD VSM, Modelo 3001 utilizado para as análises

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados pretendidos neste trabalho são o desenvolvimento de um suporte com propriedades magnéticas a partir da quitosana para a imobilização de enzimas com vista a sua utilização na produção de biodiesel.

Com este propósito numa primeira parte deste capítulo são apresentados e discutidos resultados referentes a caracterização da quitosana e alguns materiais preparados a partir da quitosana modificada procurando materiais com morfologia e propriedades apropriadas que possam vir a ser utilizados na formulação de um suporte para a imobilização de enzimas com propriedades magnéticas.

4.1 – CARACTERIZAÇÃO E MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA

Os filmes densos formulados com a técnica de evaporação do solvente (*casting*) a partir da quitosana foram caracterizados e utilizados como referência na avaliação dos materiais modificados.

4.1.1 – MORFOLOGIA DOS FILMES DE QUITOSANA

A Figura 41a) mostra a micrografia de superfície da quitosana obtida por microscopia eletrônica de varredura (MEV) antes da neutralização com NaOH. Observa-se uma superfície aparentemente lisa e contínua caracterizando o filme como denso.

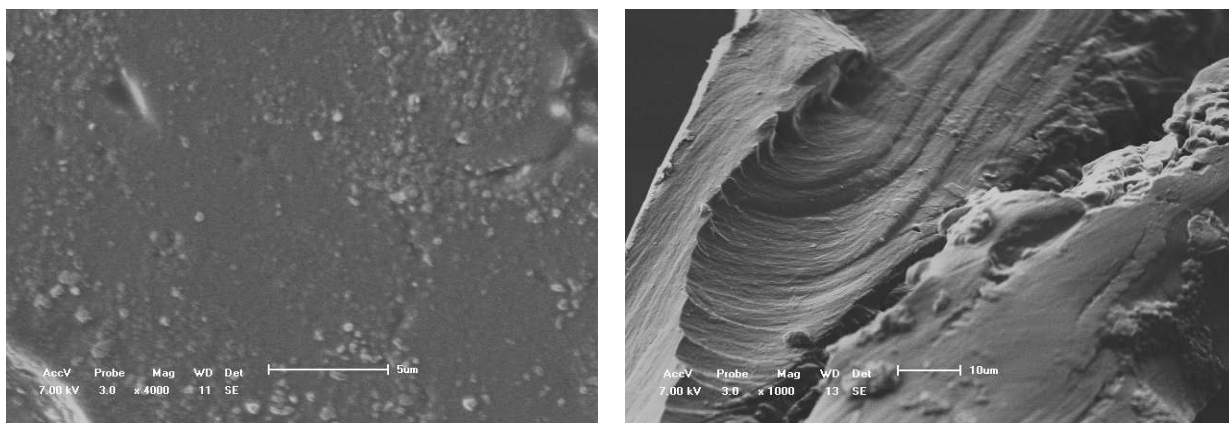


Figura 41 - Imagens MEV da superfície do filme de quitosana (a) e da seção transversal do filme de quitosana (b).

Na Figura 41(b) a seção transversal do filme de quitosana, apresenta-se contínua, com aspecto denso, não observando-se poros no volume.

As imagens de superfície do filme de quitosana por microscopia de força atômica mostradas nas Figuras 42 e 43. permitem associar a superfície a existência de um certo nível de rugosidade relativamente regular ($R_a = 1,323 \text{ nm}$)(Figura 42).

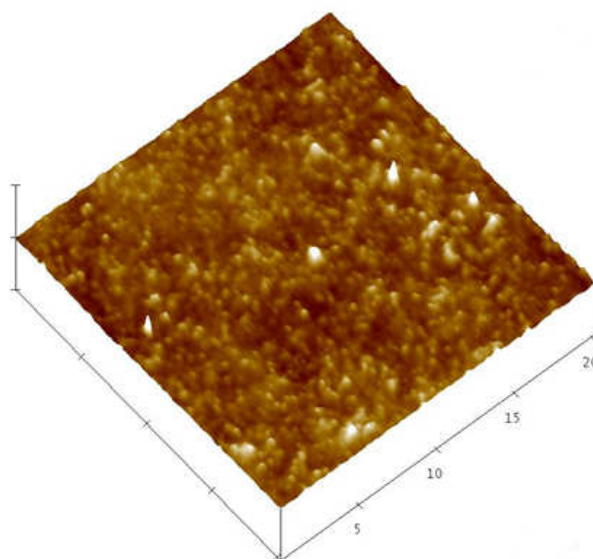


Figura 42- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de quitosana com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

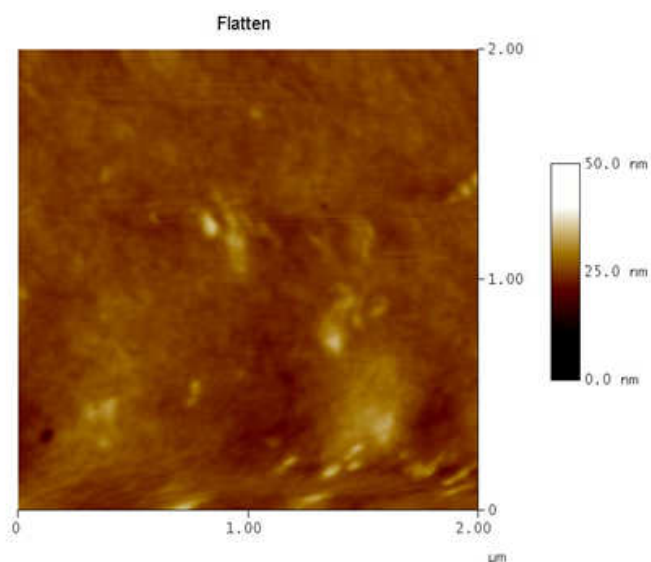


Figura 43 - Microscopia de força atômica mostrando morfologia da superfície do filme denso de quitosana com $2\mu\text{m} \times 2\mu\text{m}$ de área.

4.1.2 – CRISTALINIDADE DOS FILMES DE QUITOSANA.

Os filmes poliméricos densos foram submetidos à análise por difração de raios X. O difratograma do filme de quitosana (Figura 44) apresenta no eixo 2θ sinais a $10,5^\circ$; $19,9^\circ$; $22,2^\circ$ e $28,0^\circ$, (Ritthidej,2002) correspondendo a

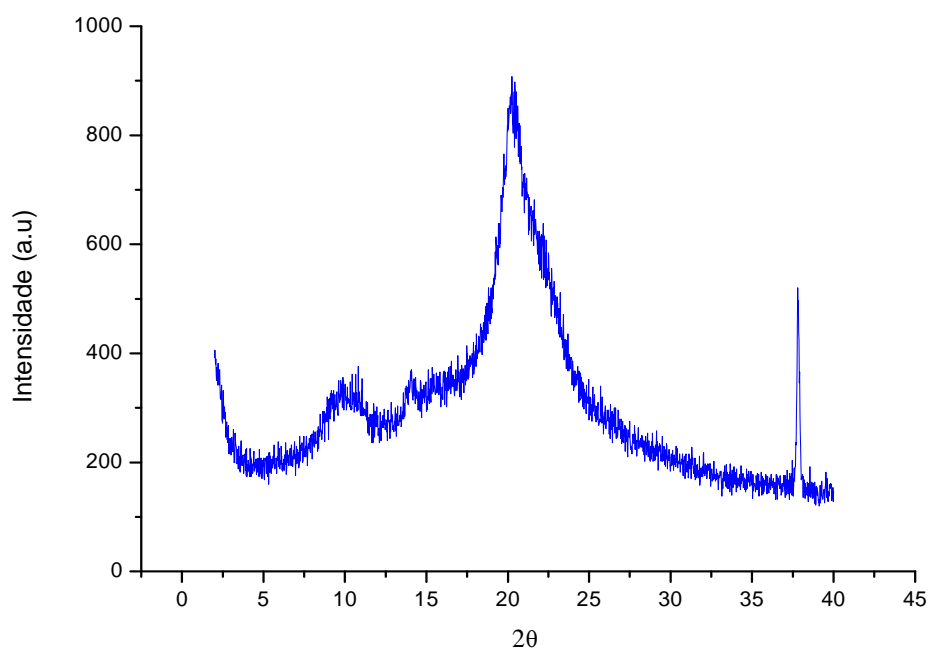


Figura 44- Difratograma do filme de quitosana neutralizado.

Nesta faixa para 2θ entre 10° - 40° , a tendência a formação de bandas largas em lugar de sinais finas são consequência da fase amorfa, originando um difratograma característico de um polímero semicristalino (SVETLANA, 2008). O filme de quitosana apresentou 56,8% de cristalinidade.

4.1.3 – ESTRUTURA DA QUITOSANA: ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO.

O espectro infravermelho (ATR) da quitosana (Figura 45) está caracterizado pela presença de uma sinal larga com máximo em torno de 3420 cm^{-1} , atribuída à deformação axial do grupo O-H associado a outros grupos polares através de pontes de hidrogênio intra e intermoleculares.

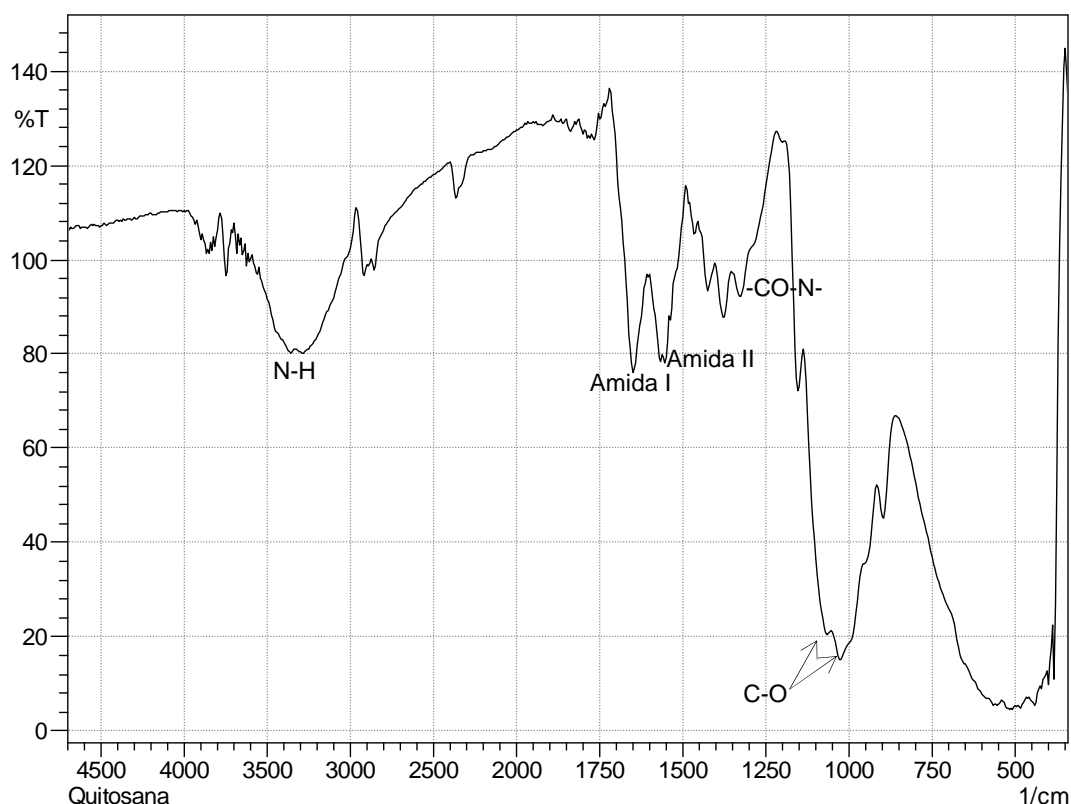


Figura 45 - Espectro de infravermelho (ATR) da quitosana.

Na região, próximo a 3300 cm^{-1} , também tem lugar a deformação axial N-H, normalmente obscurecida pela formação de pontes de hidrogênio com os grupos

OH. Sinais característicos são a 1650 cm^{-1} , correspondente a amida I, 1560 cm^{-1} , relacionada a amida II, 1070 e 1030 cm^{-1} , devido ao estiramento C-O, 1314 cm^{-1} devido ao grupo -CO-N-. O sinal intenso entre 800 e 1200 cm^{-1} está relacionado com os anéis piranosídicos.

4.1.4 – COEFICIENTE DE PERMEABILIDADE DA QUITOSANA.

Foram realizadas medidas de coeficiente de permeabilidade a água dos filmes de quitosana em diferentes temperaturas (50°C , 55°C e 60°C), utilizando uma técnica termogravimétrica conforme descrito na metodologia.

O objetivo desta determinação é avaliar o impacto da modificação na permeabilidade a vapores de água e sua possível correlação com as propriedades do suporte catalítico, estes coeficientes de permeabilidade não estão disponíveis na literatura.

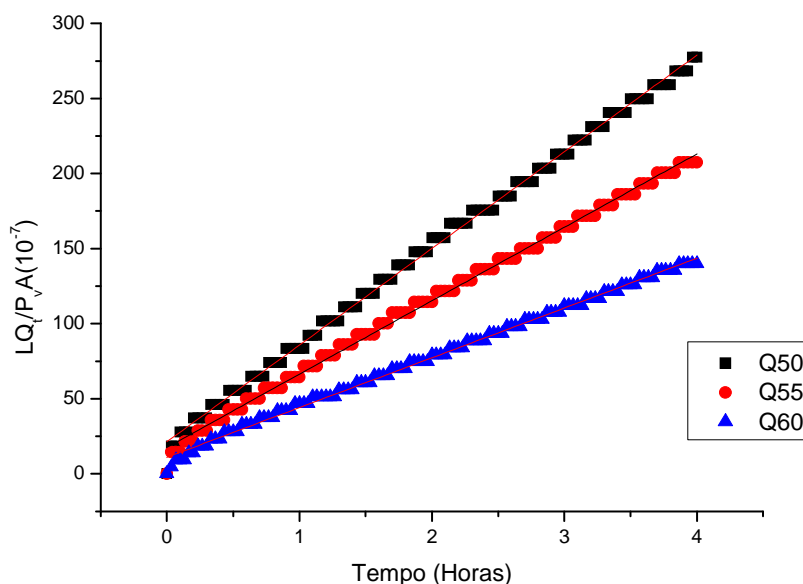


Figura 46 - Curva de tempo de retardo para o filme de quitosana utilizando água como permeante a diferentes temperaturas.

A solubilidade do vapor na matriz para o filme de quitosana nas temperaturas de 50° e 60° se modificam sensivelmente isto significa que provavelmente ambas

estão governadas pelas interações tipo ponte hidrogênio e energia envolvida é da mesmo ordem de grandeza.

4.2 – MODIFICACAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: BLENDS

4.2.1 – MORFOLOGIA DAS BLENDS.

As propriedades da quitosana podem ser modificada a partir da formação de blends que possam vir modular especificamente o balanço hidrofóbico/hidrofílico, cristalinidade, propriedades mecânicas e de transporte de massa as quais devem influenciar na efetividade do suporte catalítico.

Foram utilizados como polímeros modificadores o polióxido de etileno (PEO) e copolímeros deste com o polietileno.

O filme preparado com a blenda Q/PEO (80/20) m/m (Figuras 47(a) e (b)) possui uma superfície discretamente rugosa (a).

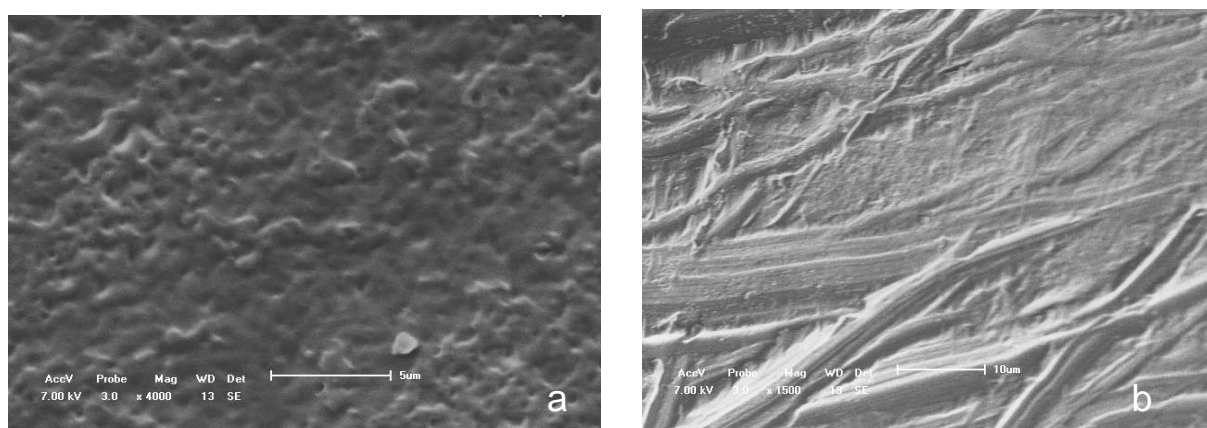


Figura 47 – Imagens de MEV: (a) Superfície e (b) Seção transversal no filme de Q/PEO (80/20).

Essa alteração na rugosidade da superfície do filme em relação ao filme de quitosana (Figura 41) pode estar relacionada à solubilização parcial do PEO, durante a neutralização e lavagem do filme, si consideramos que não foram observadas nos filmes de quitosana após neutralização devido a possível formação de vazios após

neutralização (AMIJI, 1995). Na Figura 47(b) a seção transversal do filme apresenta um aspecto de fibras entrelaçadas imersas numa matriz densa.

As imagens de AFM, para esta blenda de Q/PEO (Figuras 48 e 49), mostram que a adição de PEO na preparação da blenda origina certamente um filme com morfologia mais irregular, rugosa, ($R_a = 59,438 \text{ nm}$) que o da quitosana (Figura 41).

A imagem do filme (Figura 48) permite destacar a existência de “poços” mais profundos. A conclusão, provavelmente a mais relevante, é que não se observa a segregação da fase de PEO ou seja, nas proporções utilizadas a mistura é homogênea.

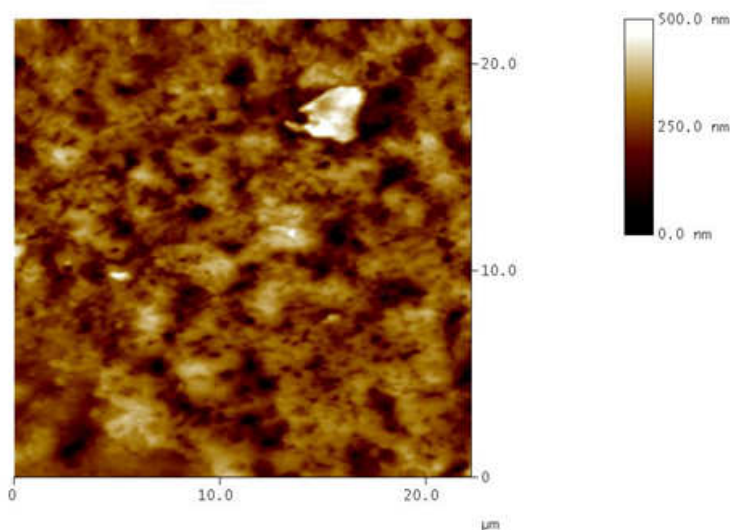


Figura 48 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

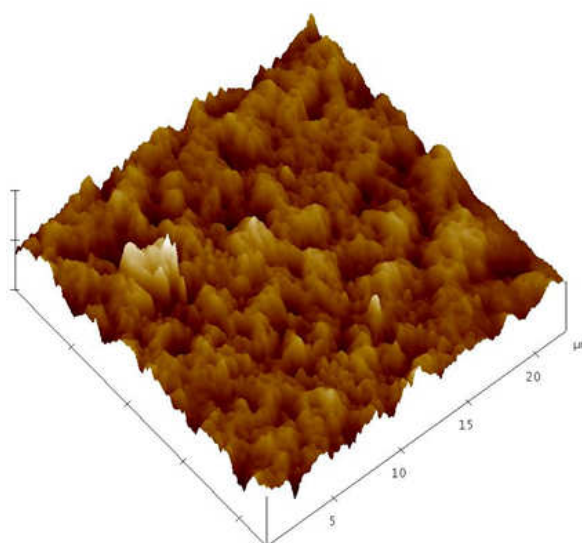


Figura 49 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PEO com $25\mu\text{m} \times 25\mu\text{m}$ de área.

Para a mistura de quitosana/PE-b-80%-PEO (80/20) m/m, os filmes preparados apresentam uma superfície, Figuras 50(a) e (b), aparentemente mais lisa que a observada para a blenda Q/PEO com a presença de defeitos em sua superfície entretanto a principal diferença se observa na seção transversal, extremadamente regular e de aspecto microporoso.

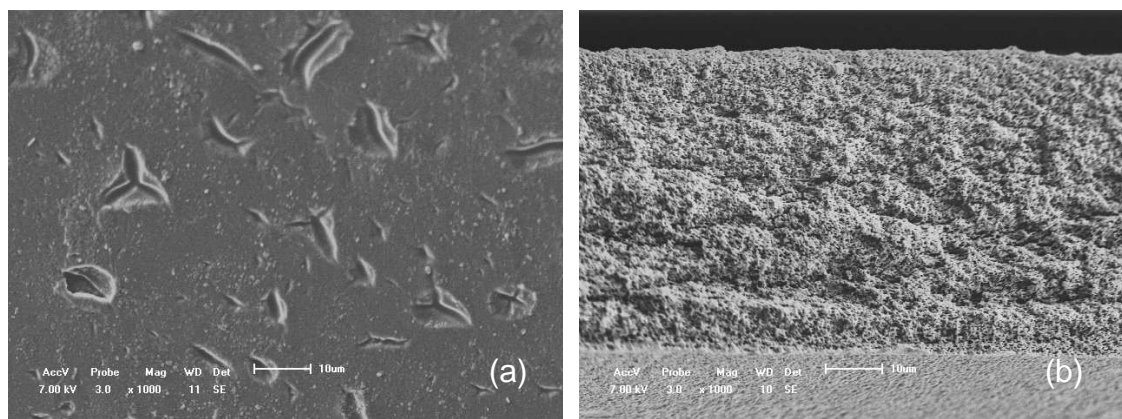


Figura 50- Imagens de MEV: (a) superfície e (b) seção transversal do filme de Q/ PE-B-80%-PEO (80/20).

A microscopia de força atômica destes filmes (Figuras 51 e 52) da blenda Q/PE-b-80%PEO indicam que a superfície é mais rugosa ($R_a = 53,340$ nm) que a do filme de quitosana.

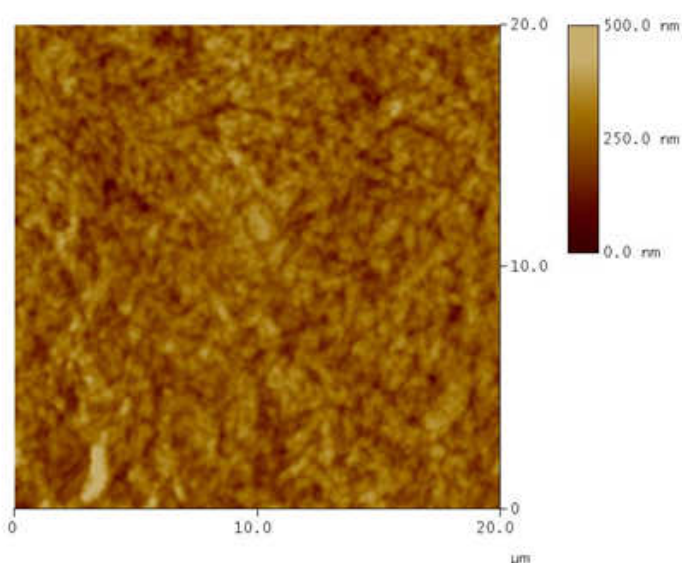


Figura 51 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20µm x 20µm de área.

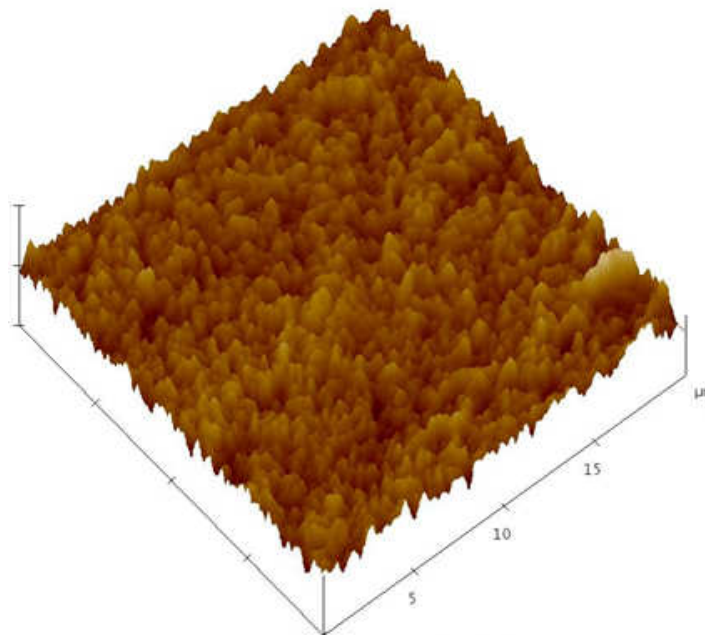


Figura 52 - Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-80%-PEO com 20 μm x 20 μm de área.

Uma vez que para efeitos de análises do impacto da presença do PEO na morfologia das blendas, analisamos a morfologia de blenda Q/PE-b-50%-PEO (80/20) m/m que apresenta a menor contribuição de PEO à mistura (Figura 53) pode-se observar uma menor rugosidade quando comparada com a blenda Q/PEO (Figura 48).

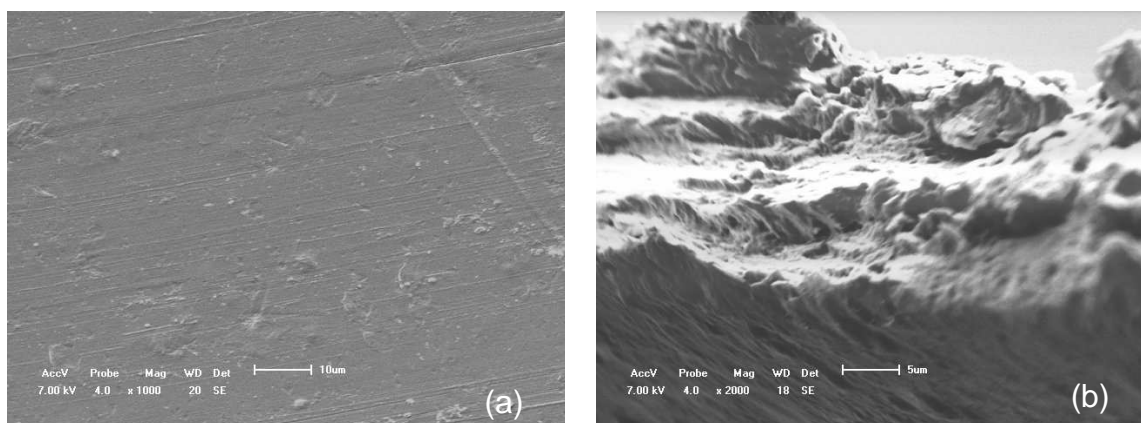


Figura 53 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-B-50%-PEO (80/20) e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-50%-PEO.

As Figuras 54 e 55 mostram as imagens de superfície e topográfica, respectivamente, dos filmes da blenda Q/PE-b-50%PEO. A adição do copolímero com 50%PEO na preparação da blenda origina realmente uma redução da

rugosidade ($R_a = 93,409 \text{ nm}$) comparada com a blenda com maior conteúdo de PEO (Q/PEO, Figura 48-49).

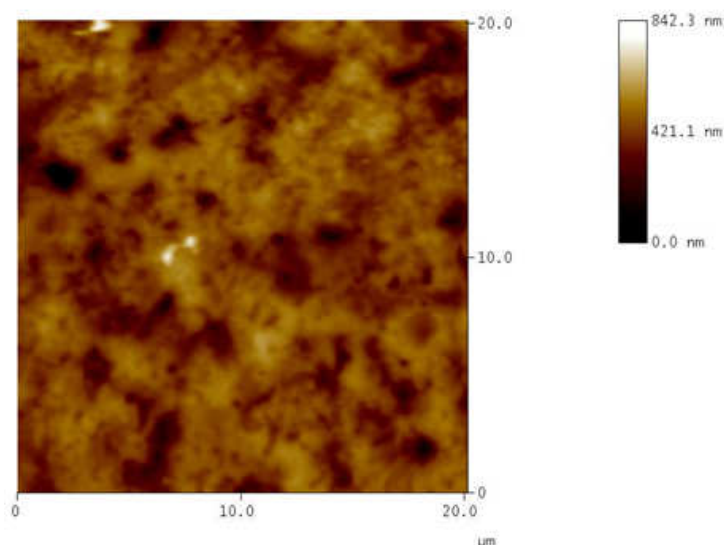


Figura 54- Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

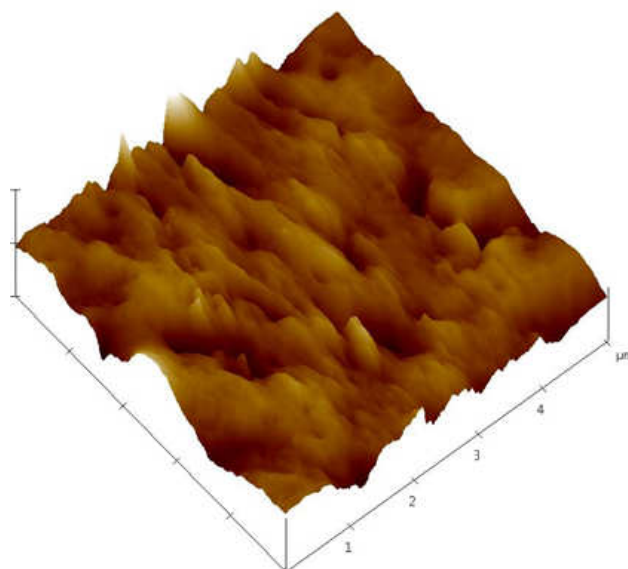


Figura 55- Microscopia de força atômica mostrando topografia do filme denso de Q/PE-B-50%-PEO com $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ de área.

A adição do copolímero modificado PE-b-80%PEOCOOH na mistura com a quitosana (80/20) introduz a possibilidade de uma maior interação entre as fases proveniente da existência dos agrupamentos COOH no copolímero e o NH_2 na quitosana e assim mudanças mais acentuadas nas propriedades da blenda principalmente no referido a mudanças no balanço hidrofóbico/hidrofílico do suporte.

No filme da blenda Q/PE-b-80%PEOCOOH (Figura 56), se observam a presença de bolhas que não forma observadas no filme da quitosana provavelmente devido ao efeito do banho de NaOH sobre a fase PE-b-80%PEOCOOH e a contribuição de um possível efeito de aeração do filme.

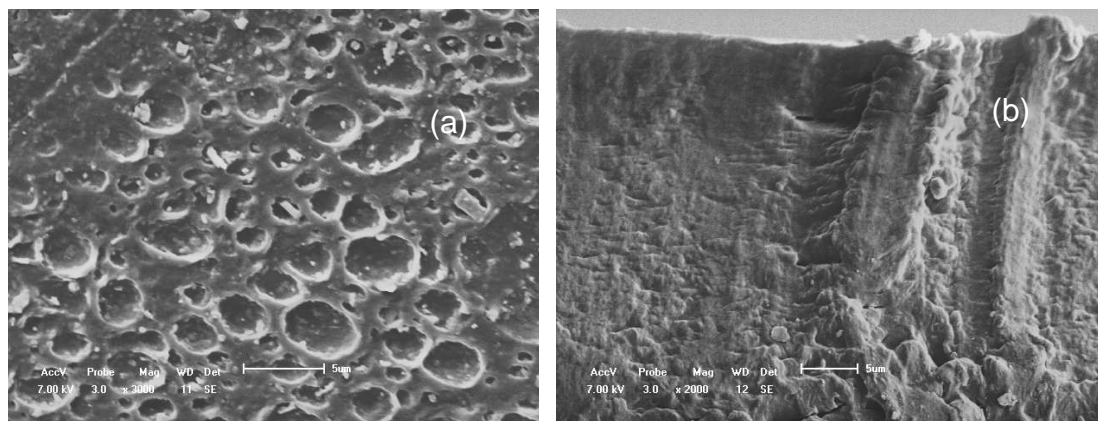


Figura 56 - Imagens de MEV: (a) imagem superficial do filme de Q/PE-b-PEO-COOH e (b) imagem do corte transversal no filme de Q/ PE-B-PEO-COOH.

As imagens de superfície e topográfica, Figuras 57 e 58 respectivamente, do filme da blenda Q/PE-b-80%PEOCOOH evidenciam a existência de uma topografia mais irregular que as blendas analisadas anteriormente e a quitosana pura.

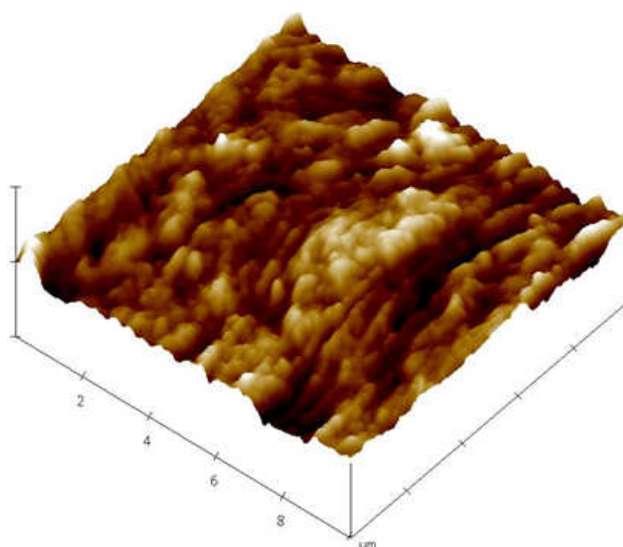


Figura 57- Microscopia de força atômica mostrando a topografia do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20µm x 20µm de área.

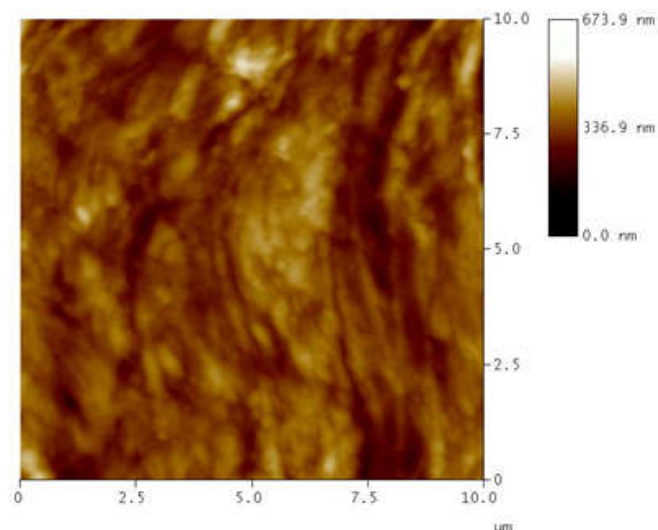


Figura 58 - Microscopia de força atômica mostrando a superfície do filme denso de Q/PE-B-PEO-COOH com 20 μ m x 20 μ m de área.

A rugosidade encontrada ($R_a = 63,385$ nm) também é maior tornando o filme mais irregular. Este resultado, ao menos em teoria não era esperado considerando principalmente a possibilidade de uma maior interação entre as fases si comparado com as blendas de PEO e os copolímeros PE-b-x%PEO.

A Tabela 1 apresenta os parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.

Tabela 1- Valores dos parâmetros de rugosidade da superfície dos filmes de Q e misturas Q/PE-b-x%PEO.

Filme	R_a (nm)	R_q (nm)	z (nm)
Q	1,323	1,762	27,057
Q/PEO	59,438	77,995	792,17
Q/PE-b-80%PEO	53,340	67,265	569,06
Q/PE-b-50%PEO	93,409	137,98	1,226
Q/PE-b-PEOCOOH	63,385	87,543	1,028

4.2.2 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA CRISTALINIDADE.

A Figura 59 mostra os difratogramas de difração de raios X para os filmes de quitosana e o as blendas preparadas com o PEO os copolímeros PE-b-x%PEO.

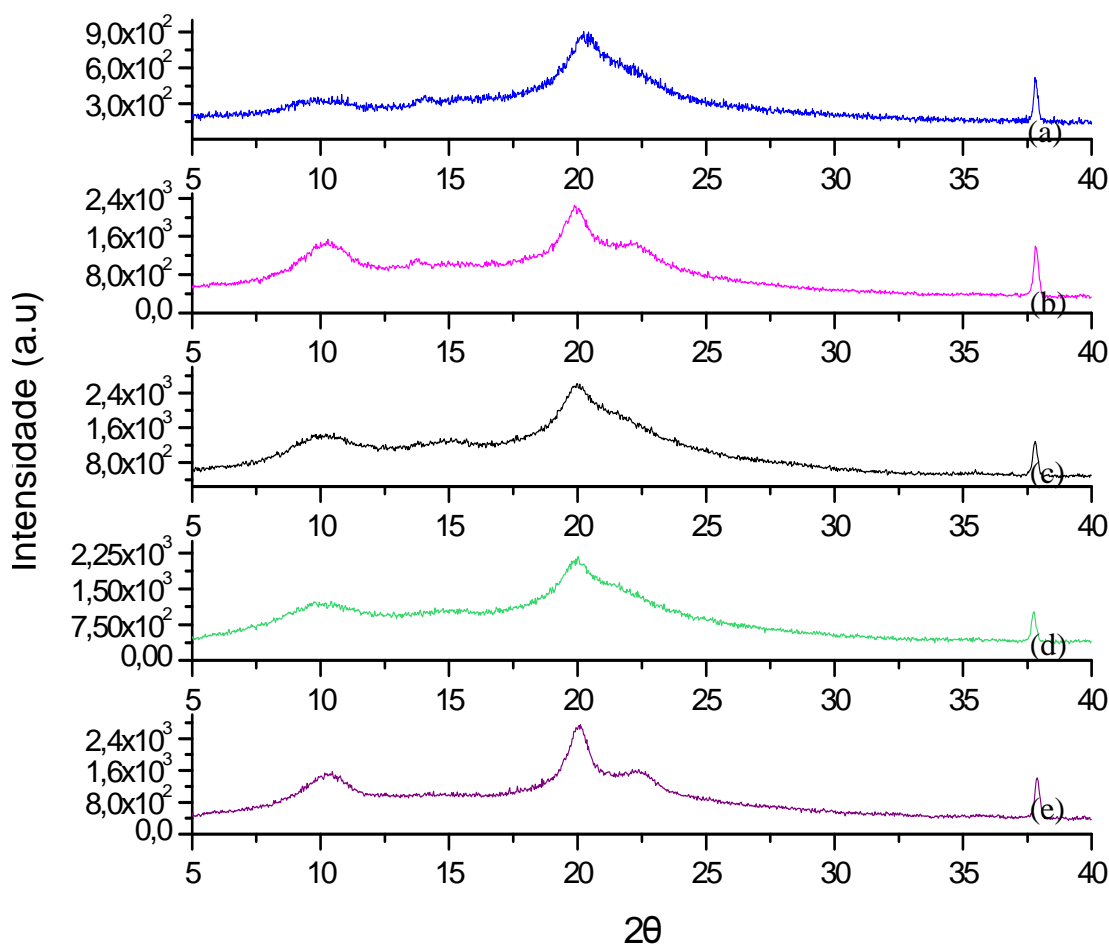


Figura 59 - Difratograma dos filmes de quitosana pura (a), Q/PE-B-50%-PEO (b), Q/PE-B-80%-PEO (c), Q/PE-B-PEO-COOH (d) e Q/PEO (e)

Os picos cristalinos da quitosana a $8,3^\circ$, $19,9^\circ$, $22,2^\circ$ e $28,0^\circ$, tem sua intensidade modificada nas misturas com o PEO e os copolímeros.

Os valores da percentagem de cristalinidade calculados (Tabela 2) indicam que a adição do copolímero com maior contribuição de PEO e do PEO se observa uma diminuição da cristalinidade na blenda mais acentuada quando maior foi a

presença do PEO em relação a quitosana não modificada e ainda maior para o copolímero PE-b-80%PEOCOOH.

Tabela 2 - Cristalinidade das blendas de quitosana.

Polímero	Cristalinidade (%)
Q	56,83
Q/PE-b-50%-PEO	57,69
Q/PE-b-80%-PEO	47,32
Q/PEO	40,47
Q/PE-b-%80PEOCOOH	29,08

Considerando a estrutura do PEO e do copolímero modificado Q/PE-b-%PEO-COOH, parece ser consequência de uma maior interação entre as fases o que pode vir a dificultar o processo de cristalização da quitosana.

4.2.3 – MODIFICAÇÃO FÍSICA DA QUITOSANA: INTERAÇÕES ENTRE AS FASES POLIMÉRICAS.

A análise das interações entre a quitosana e o polióxido de etileno e seus copolímeros nas blendas formuladas foi realizado com auxílio da espectroscopia infravermelha (Figura 60).

As absorções dos agrupamentos existentes nas estruturas do PEO e os copolímeros basicamente são mascaradas pelas absorções da fase em maior proporção (80%) a quitosana, apenas destaca-se a contribuição dos estiramentos C-H a 2900 cm^{-1} que faz modificar a relação de intensidade entre as sinais na região de 3400 cm^{-1} devida aos estiramentos OH.

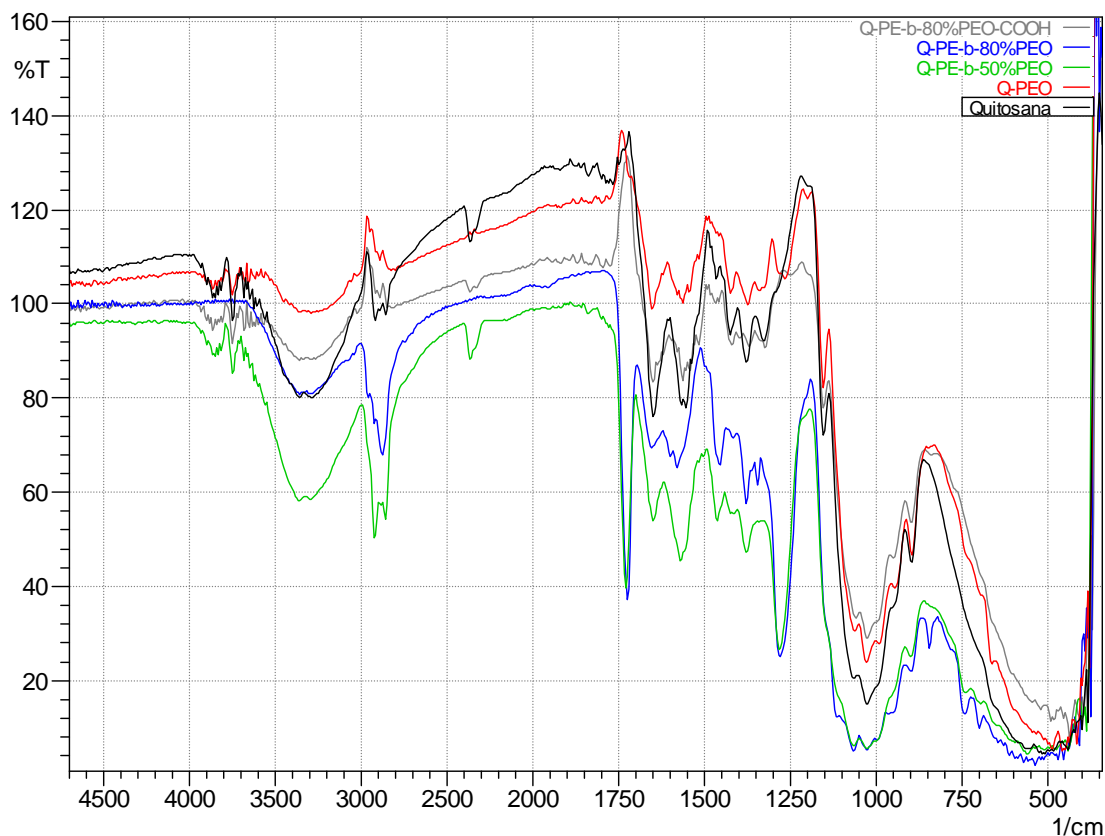


Figura 60- Espectros de infravermelho (ATR) da quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros PE-PEO.

Os espectros das blendas não acrescentam informação em relação as possíveis interações existentes entre as fases, responsáveis pela homogeneidade observada na microscopia eletrônica de força atômica.

4.2.4 – TRANSPORTE DE MASSA: PERMEABILIDADE

As medidas de coeficiente de permeabilidade para a quitosana e as blendas com o PEO e os copolímeros foram obtidas utilizando como permeante vapores de água em diferentes temperaturas (50°C, 55°C e 60°C) com o propósito de determinar as energias de ativação associadas ao processo de permeação destes vapores nos filmes densos.

As Figuras 61 - 63 apresentam as curvas de tempo de retardo (*time lag*) em função do tempo para as diferentes temperaturas para as blendas preparadas com o

PEO os copolímeros PE-b-x%PEO. As maiores diferenças observadas nestas curvas aparecem para a temperatura de 50 °C para as blendas de Q/PEO e Q/ PE-b-80%PEO.

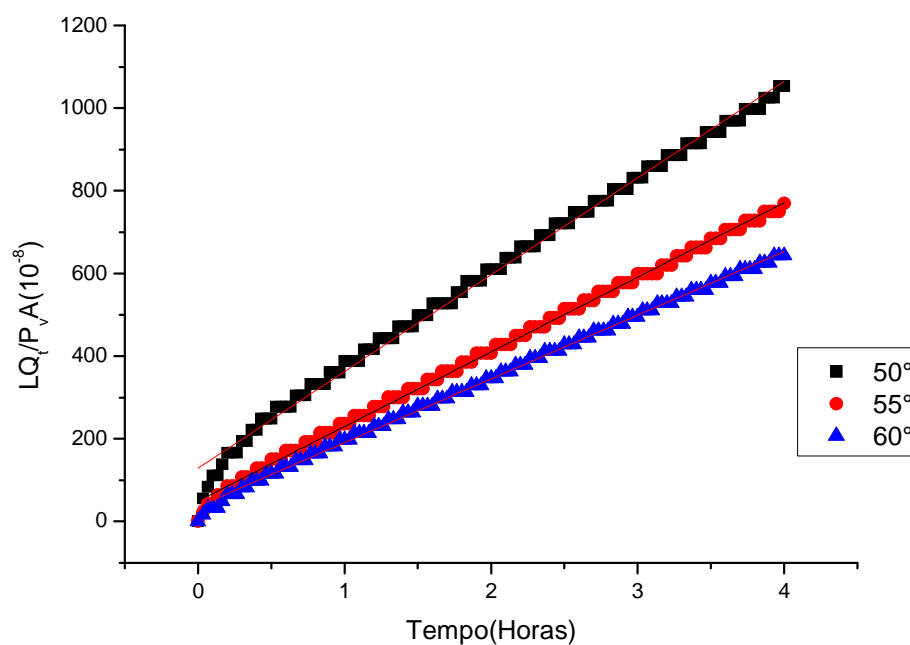


Figura 61- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C

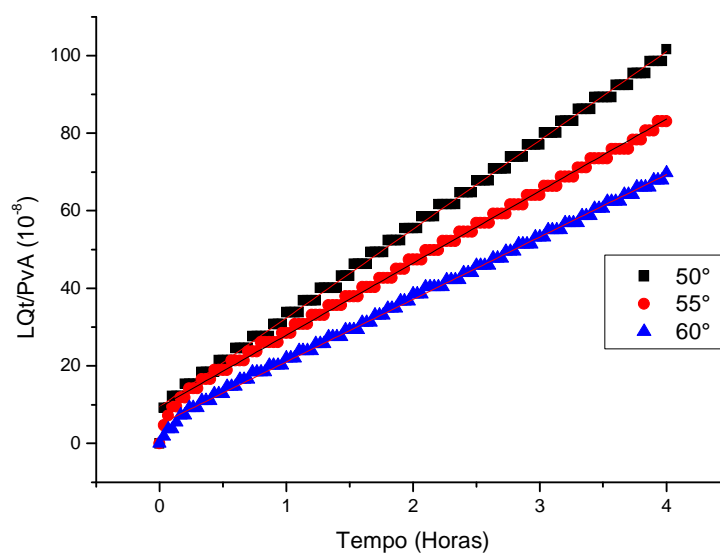


Figura 62- Gráfico LQt/PvA versus tempo para a blenda Q/PE-b-80%PEO nas temperaturas de 50°, 55° e 60°

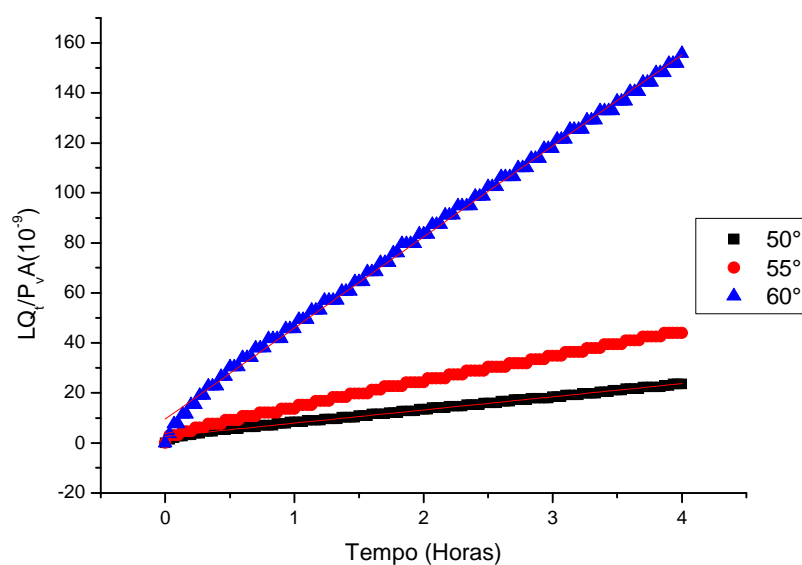


Figura 63- Gráfico LQ_t/P_vA versus tempo para a Q/PE-b-80%PEO-COOH nas temperaturas de 50°, 55° e 60°C

Os valores de permeabilidade obtidos a partir do estudo do tempo de retardo (Tabela 3) a diferentes temperaturas apresentaram mudanças pequenas na inclinação das curvas (Figuras 21-23) para cada uma das blendas estudadas, diferentemente do observado para a quitosana. Este comportamento no caso das blendas indica uma fraca dependência com a temperatura na faixa de 50-60°C

Tabela 3 - Tabela de coeficientes de permeabilidade das blendas (inéditos não disponíveis na literatura).

<i>Temperatura(°C)</i>	<i>Polímero</i>	<i>Coeficientes de permeabilidade (Barrer)</i>
50	Q	$6,44 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$2,34 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$2,29 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$5,27 \times 10^{-7}$
55	Q	$4,89 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$1,80 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$1,86 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$4,60 \times 10^{-7}$
60	Q	$3,32 \times 10^{-7}$
	Q/PEO	$1,54 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%-PEO	$1,61 \times 10^{-7}$
	Q/PE-b-80%PEO-COOH	$3,64 \times 10^{-7}$

As diferenças nos valores de permeabilidade observados para a quitosana não podem ser explicados a partir da porcentagem de cristalinidade dos filmes de quitosana em relação a as blendas estudadas já que o efeito barreira da fase cristalina originaria uma diminuição do coeficiente de difusão e assim originar uma diminuição da permeabilidade ($P=DH$).

Uma explicação destes resultados pode estar relacionada com as interações específicas tipo ponte de hidrogênio que podem ter lugar entre o vapor da água e os grupos polares da quitosana o qual deve favorecer a permeação através do filme.

Em misturas poliméricas a permeabilidade é dependente da interação entre as fases. Assim nas blendas com o PEO e o copolímero PE-b-80%PEO a interação com as moléculas da água decresce e podem vir ser menores que as forças coesivas existente entre as moléculas da água ou que favoreceria a formação de “clusters”, diminuindo a permeabilidade deste filmes.

Na blenda da Q com Q/PE-b-80%PEO-COOH os valores de permeabilidade são maiores que nas outras blendas a consequência de sua menor cristalinidade e por tanto uma maior permeabilidade que a encontrada para a blenda Q/PEO e Q/PE-b-80%PEO.

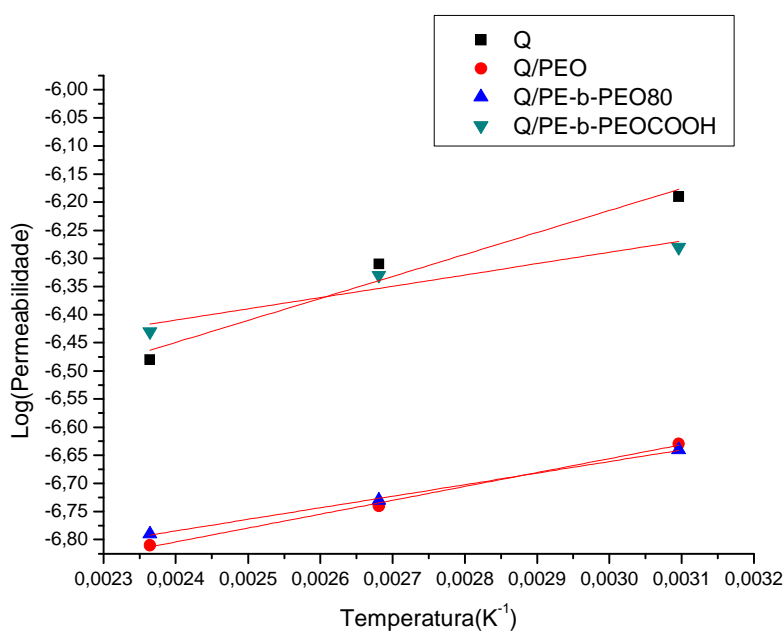


Figura 64- Coeficiente de permeabilidade em escala logarítmica versus o inverso da temperatura

As variações da permeabilidade para a quitosana e suas blendas a diferentes temperaturas (Figura 64) estão influenciadas principalmente pelo coeficiente de solubilidade (H) do diferentes filmes e no caso das blendas adicionalmente existe o efeito do PEO e os copolímeros nas propriedades da fase amorfa.

As energias de ativação associadas ao processo de permeação mostradas na Tabela 4 apontam diferenças entre a quitosana e as blendas que estão relacionadas com a maior mobilidade da fase amorfa nas blendas em relação a quitosana ou que favorecera a difusão das moléculas de permeante (água).

Tabela 4 Energias de ativação da permeação a água para as blendas de quitosana

<i>Blenda</i>	<i>Energia de ativação (KJ/mol)</i>
Quitosana	390,8
Q/PEO	246,9
Q/PE-b-80%PEO	205,5
Q/PE-b-80%PEOCOOH	200,7

Estes resultados reforçam a interpretação dada anteriormente. No processo de permeabilidade ($P = DH$) o coeficiente de solubilidade (H) da quitosana é que determina as diferenças encontradas em relação a suas blendas.

4.2.5 – DIFUSIVIDADE TÉRMICA

Foram realizadas medidas de difusividade térmica para caracterizar o comportamento térmico das blendas de quitosana (Figuras 65-67).

A Figura 65 apresenta a amplitude do sinal em função da frequência modulada para a blenda de Q/PEO, pode ser observado que para modulações de frequência de 10 Hz a escala de amplitude do sinal tem valor de $f^{0,062}$, este valor sugere que a blenda tem baixa flexão termo elástica. Na Figura 65 são apresentados os dados experimentais e o ajuste aos dados pela expressão teórica. O valor da difusividade térmica obtida a partir do ajuste dos dados foi $3,86 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$. Para a blenda de Q/PE-b-80%PEO apresentada na Figura 66, verifica-se que a amplitude do sinal diminui bruscamente para $f^{2,1}$ e nesta faixa a característica termo elástica é predominante e o valor da difusividade térmica tem um aumento significativo cerca de 55%, $5,99 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$ do valor referente à blenda de Q/PEO.

A blenda de Q/PE-b-80%PEO-COOH mostrada na Figura 67, exibe um comportamento diferenciado, o valor de difusividade térmica é muito elevado $16 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{s}$, o ajuste dos dados experimentais é feito de forma a aproximar os dados do modelo teórico e neste caso a dispersão é muito alta, o que pode ser associado à interação do grupo carboxila deste copolímero modificado.

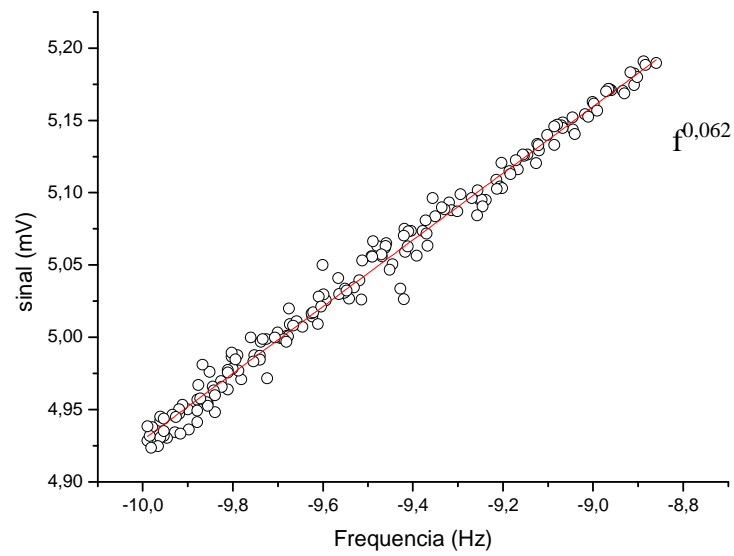


Figura 65- Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PEO.

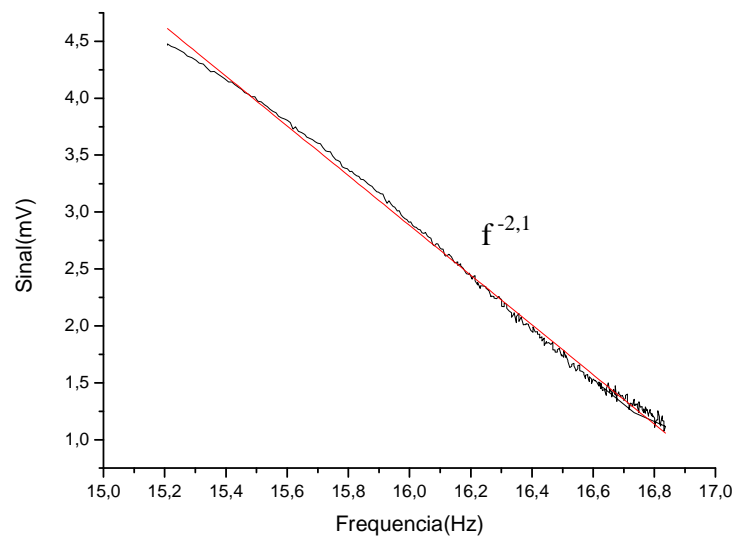


Figura 66 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO.

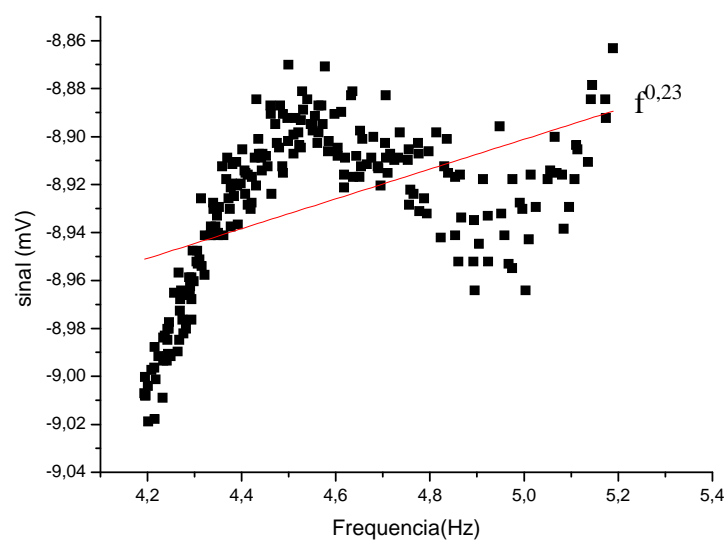


Figura 67 - Gráfico Log-Log da amplitude do sinal fotoacústico em função da frequência para a blenda Q/PE-b-80%PEO-COOH.

4.1.7 – DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE TÉRMICA

Na Figura 68, apresenta-se a evolução temporal da temperatura para as blendas. Essa evolução permite obter a capacidade térmica específica, a curva superior representa o aumento de temperatura da amostra quando exposta à iluminação. A curva inferior representa a interrupção da chegada da luz à amostra após a temperatura da mesma atingir o patamar de saturação. A Tabela 5 resume os valores encontrados para a capacidade térmica específica após os ajustes experimentais.

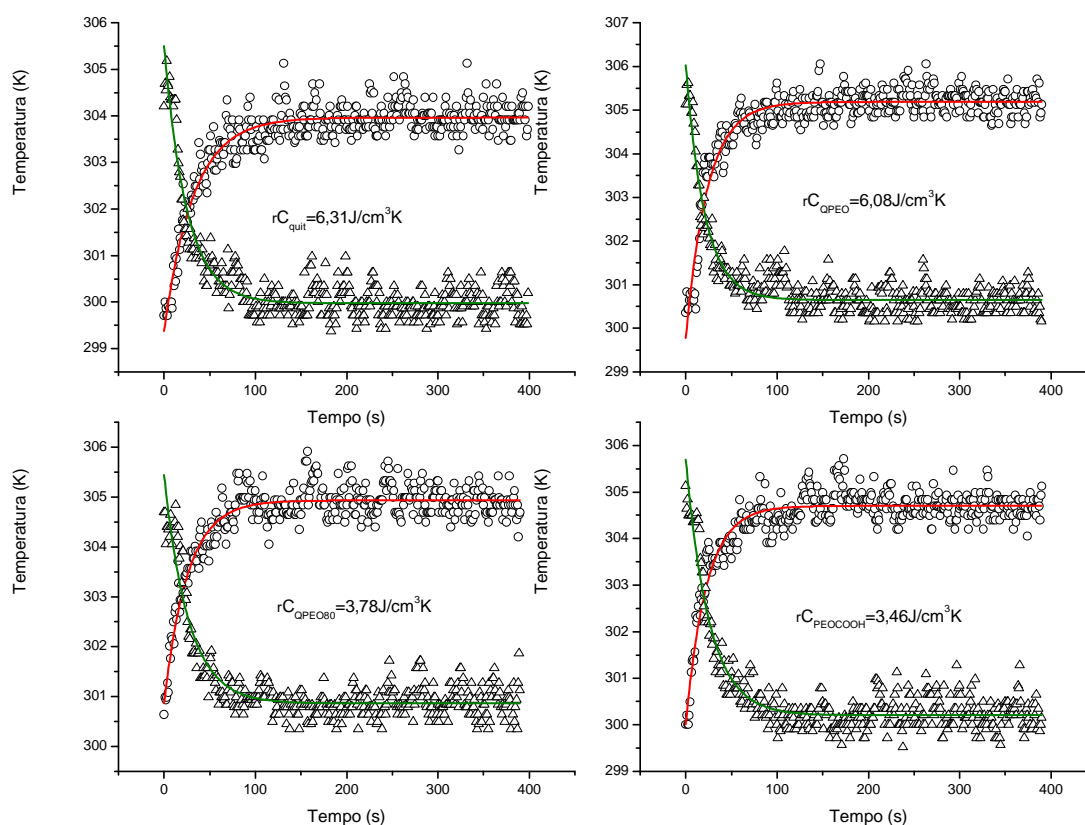


Figura 68- Evolução da temperatura com o tempo para as blendas

Tabela 5 - Propriedades térmicas das blendas obtidas através das propriedades fototérmicas

<i>Amostra</i>	<i>Capacidade térmica específica (J/cm³K)</i>	<i>Difusividade térmica (cm²/s)</i>	<i>Espessura do filme (μm)</i>
Quitosana	6,31	-	-
Q/PEO	6,08	$3,86 \times 10^{-4}$	56
Q/PE-b-PEO80%	3,78	$5,99 \times 10^{-4}$	87
Q/PE-b-PEO-COOH	3,46	16×10^{-4}	85

Nota-se que nos copolímeros ocorre uma queda no valor da capacidade térmica específica. Sendo a capacidade térmica específica a quantidade de energia

necessária para elevar em 1°C a massa do polímero ou a blenda é esperada esta diminuição uma vez que a energia de ativação para as blendas diminui em função da quantidade PEO nas blendas.

4.2.7 – CARACTERIZAÇÃO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO E MECÂNICO DA QUITOSANA E SUAS BLENDA.

As curvas calorimétricas diferenciais (DSC) da quitosana e as blendas com PEO os copolímero PE-b-%80 PEO e PE-b-80%PEO-COOH não apresentam um comportamento térmico marcadamente diferente.

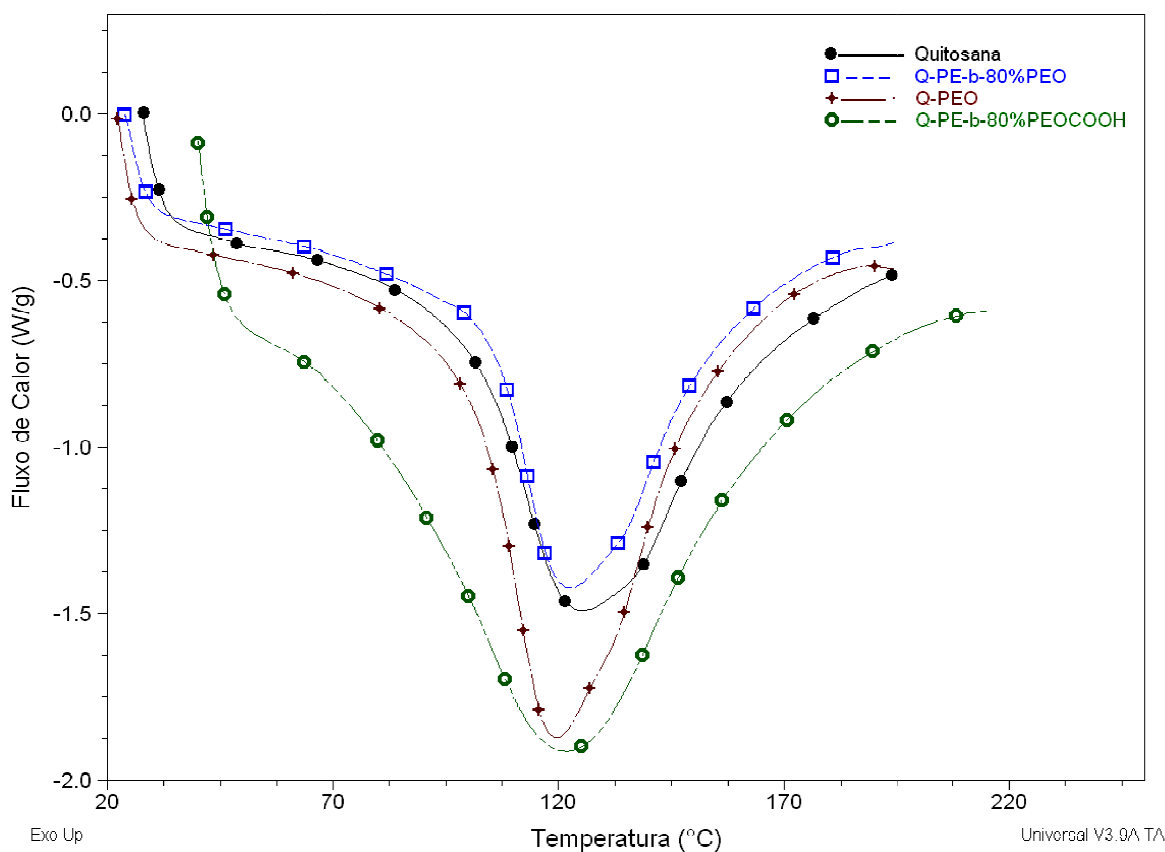


Figura 69 - Curvas de DSC para os filmes de quitosana e sua blendas

As temperaturas de fusão (Tabela 6) diminuem levemente na mistura com o PEO os copolímeros.

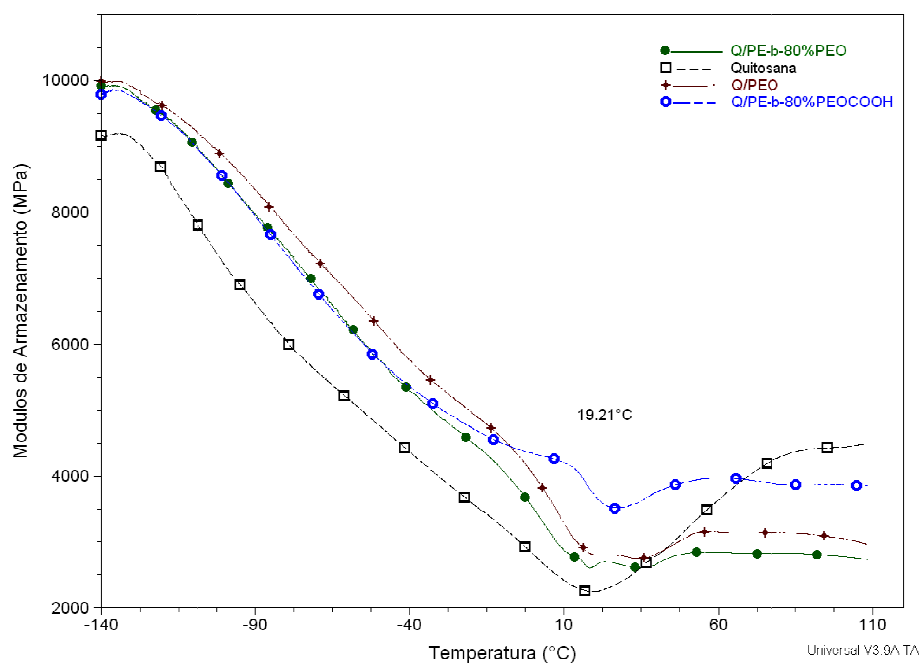
Tabela 6 - Temperaturas de fusão da quitosana e suas blendas

Polímero/Blenda	$T_m/^\circ\text{C}$
Q	125,5
Q-PEO	119,6
Q-PE-b-80%PEO	122,5
Q-PE-b-80%PEOCOOH	121,8

A diminuição da T_m acompanha principalmente ao conteúdo de PEO na mistura.

O comportamento dinâmico mecânico (DMA) (Figuras 70-72) dos filmes em estudo apresentam módulos com valores próximos. Sua principal diferença está no fenômeno de cristalização que se observa a partir de temperaturas próximas a 20 °C.

Nas blendas a cristalização e o impacto da cristalização é mais discreto, e como constatado nas análises por difração de raios x, acontece em menor extensão, apresentando módulos acima de 20°C menores que o da quitosana.

**Figura 70-** Módulo de armazenamento (E') para a quitosana e blendas

O comportamento observado nos módulos de perda (Figura 71) permite identificar a maior heterogeneidade das fases nas misturas.

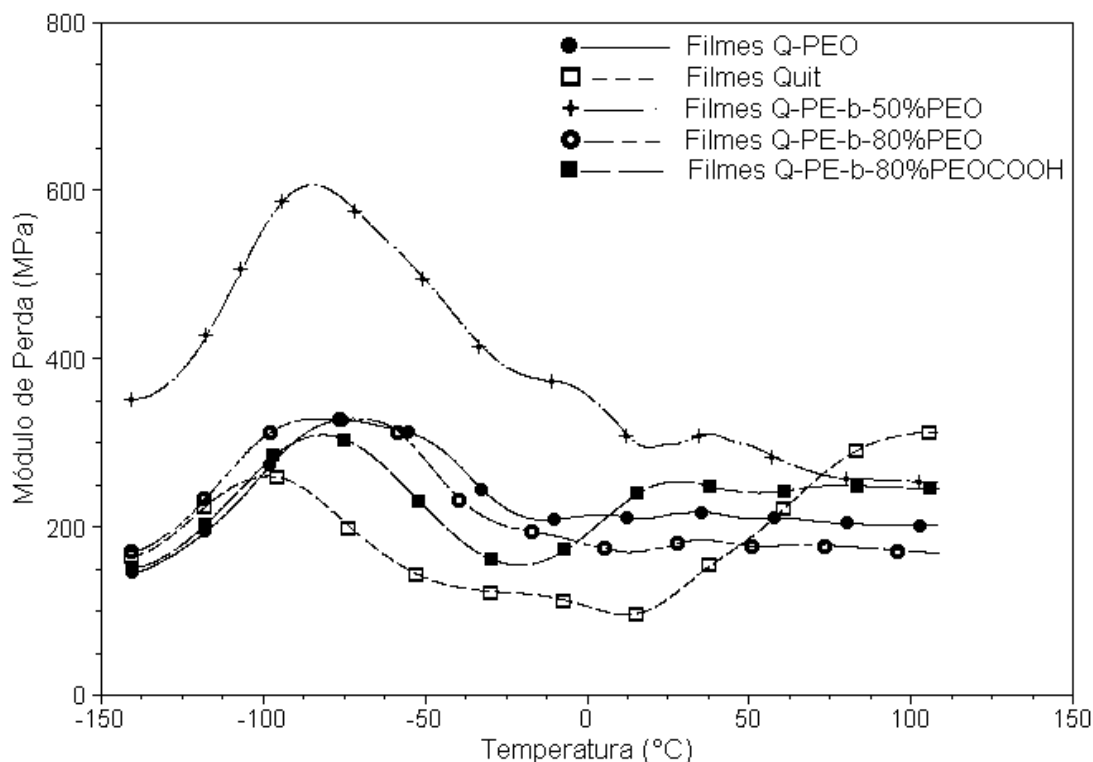


Figura 71- Módulo de perda para quitosana e blendas.

Em geral os filmes formulados com a quitosana modificada são mais rígidos que o de quitosana em temperaturas relativamente baixas (inferior a 10 °C). Entretanto em geral como pode ser constatado na Figura 71 a temperaturas acima de 20 °C os filmes das blendas com exceção da blend a com PE-b-50%PEO, parecem apresentar uma menor tendência a cristalizar (o módulo E' não aumenta) que o filme de quitosana.

Os registros da curva $Tg \delta$ (Figura 72) mostram uma relaxação β nas blendas e quitosana associada aos grupos (-CH₂OH) presentes na quitosana (Chao, 2004). As temperatura mais altas encontradas para estas transições nas blendas em relação a quitosana denota a existência de interação entre as fases, próprio de uma mistura ou blenda miscível.

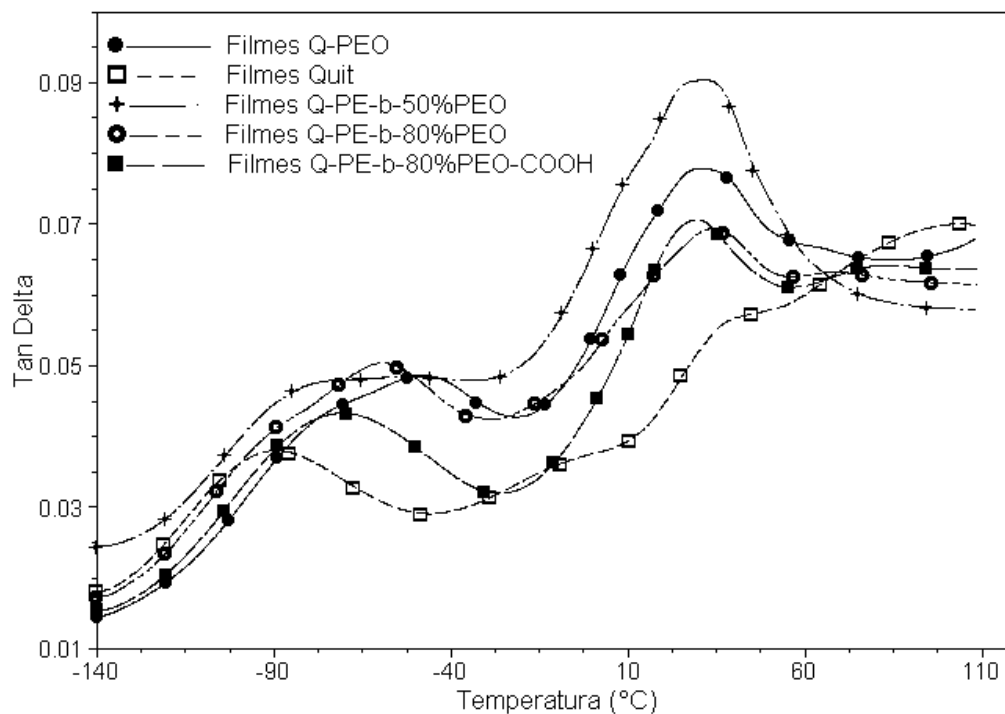


Figura 72-Tangente de delta para quitosana e blendas

Outra diferença é a existência de sinais mais largas nas blendas em relação a quitosana indicativo da maior heterogeneidade dos domínios nas blendas.

O estudo da modificação da quitosana utilizando o PEO e os copolímeros PE-b-PEO permitiram caracterizar estes sistemas como miscíveis, entretanto não mostram diferenças significativas entre estas blendas e a quitosana em relação a suas propriedades de transporte, morfológicas e mecânicas.

4.3 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS MAGNETICAS A PARTIR DA QUITOSANA OBTIDAS POR *SPRAY DRYING*.

As blendas formuladas e caracterizadas foram utilizadas na formulação das microcápsulas contendo núcleos magnéticos considerando as diferenças encontradas principalmente na cristalinidade dos materiais e o possível impacto das diferenças que introduzem o PEO e os copolímeros no balanço hidrofóbico/hidrofílico da blenda em relação a quitosana.

As microcápsulas produzidas utilizando a técnica de *spray drying* foram preparadas a partir da quitosana e suas blendas com PEO, PE-b-80%PEO, PE-b-80%PEO-COOH nas proporções (80/20)m/m.

As microcápsulas de magnetita (Fe_3O_4) utilizadas foram obtidas utilizando o método da coprecipitação (Yang *et. al.*, 2008). As microcápsulas de magnetita foram sintetizadas a partir de reações de soluções aquosas de 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 hidróxido de amônio em reator.

A obtenção das microcápsulas de quitosana e quitosana modificada foram feitas segundo os parâmetros apresentados na Tabela 7, ressaltando que foi utilizados dois agentes reticulantes para a quitosana, o PEO e seus copolímeros e o TPF. O objetivo foi estabelecer a influência e a contribuição de cada um na modificação das propriedades da quitosana.

Tabela 7 - Parâmetros utilizados na obtenção de microcápsulas de quitosana

Amostras	T_i(°C)	T_s(°C)	Φ(NL/h)	Aspirador(%)	Bomba (mL/min)
Q/ Fe_3O_4	135	90	600	90	15
Q/TPF/ Fe_3O_4	135	87	700	99	15
Q/PEO/ Fe_3O_4	135	88	700	99	13
Q/ PE-b-PEO80/ Fe_3O_4	135	93-95	700	99	11
Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	135	93	700	99	8

4.3.1 – ESTABILIDADE TÉRMICA E PORCENTAGEM DE Fe_3O_4 NAS MICROCAPSULAS.

A Figura 73 mostra as curvas de variação de massa em função da temperatura obtidas através da análise termogravimétrica para as microcápsulas magnéticas (Tabela 8).

Observa-se que a degradação da matriz polimérica ocorre, no mínimo, em dois estágios. O primeiro referente à perda de água retida na matriz, e o segundo, referente à degradação da fase polimérica.

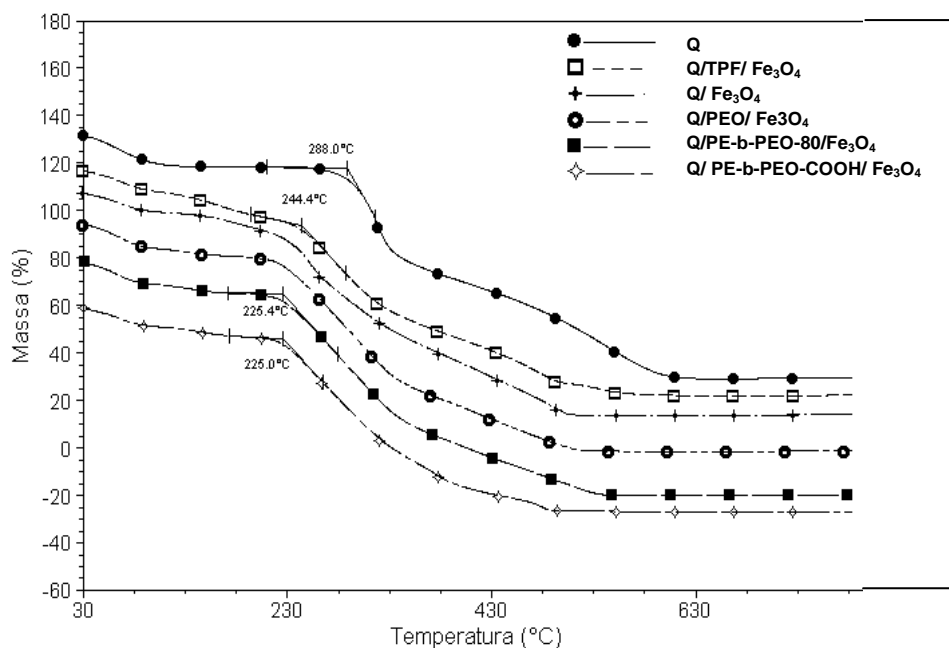


Figura 73- Análises termogravimétricas para as microcápsulas com núcleo de Fe_3O_4 .

O primeiro estágio, esta associado com a perda da água na matriz polimérica, e permite calcular as porcentagens de água retida pela microcápsula (Tabela 8).

Tabela 8 - Porcentagem de magnetita e água nas microcápsulas

<i>Microcápsulas</i>	% H_2O	% Nano-Magnetita
Q/TPF/ Fe_3O_4	9,2	7
Q/ Fe_3O_4	8,5	8,2
Q/PEO/ Fe_3O_4	10,2	6,6
Q/PE-b-PEO-80/ Fe_3O_4	9,7	4,2
Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4	8,1	16,5

Os valores indicam a existência de uma relação entre o porcentagem de água retida e o conteúdo de PEO e ainda mostra o impacto da modificação do copolímero PE-b-80%PEO-COOH sobre a água retida na matriz. Este resultado esta de acordo com a interpretação dada aos resultados do módulo de perda, DMA, (Figura 74) no que se associa o deslocamento da transição β a interações entre as fases com participação dos grupos hidroxilas.

Em temperaturas superiores (~ 230 °C), observa-se que as microcápsulas, formuladas com as blends, apresentam uma discreta redução da temperatura “onset” do processo de degradação. Esta diminuição no resulta significativa para o

uso previsto como suporte catalítico de um processo que no se realiza a temperaturas tão altas devido a estabilidade das enzimas imobilizadas.

A derivada da curva de variação de massa (DTG) (Figura 74) permitem apreciar com maior detalhe as diferenças entre as blends e a quitosana.

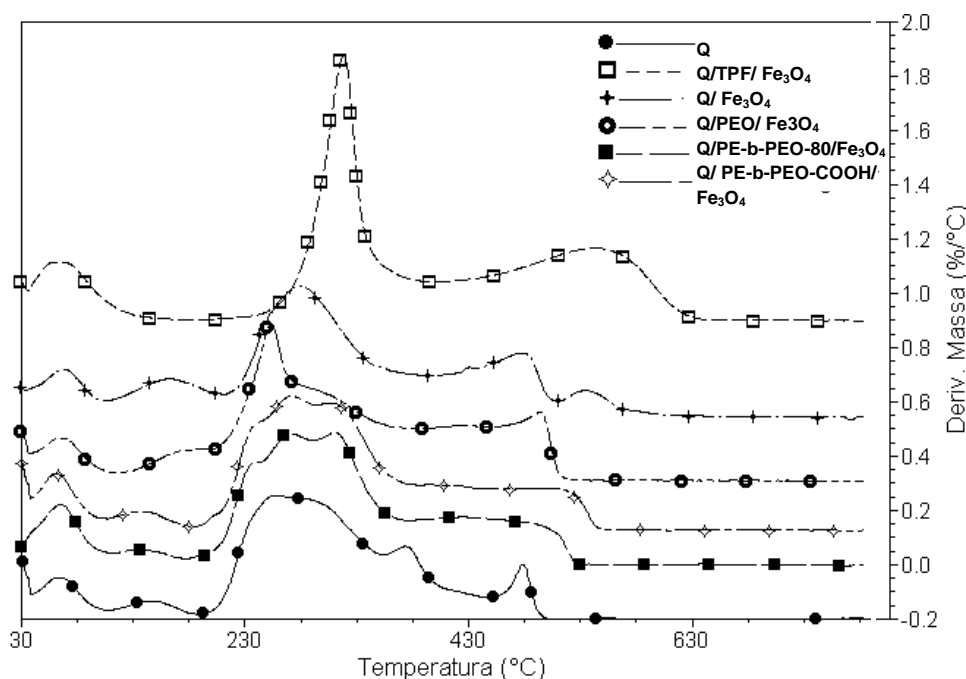


Figura 74 - DTG das microcápsulas de quitosana com núcleo de magnetita.

Em particular destaca-se como a contribuição do PEO modifica o processo de degradação entre 208-400 °C e a presença das terminações carboxílicas na blenda Q-PE-b-80%PEO-COOH.

As cargas das microcápsulas (Tabela 9) determinadas a partir do resíduo registrados nas curvas termogravimétricas (Figura 73) indicam a carga de magnetita que constitui o núcleo das microcápsulas.

Os valores (% carga) encontrados particularmente diferentes nas blends com o copolímero PE-b-80%PEO, esta associado a menor solubilidade desta fase (PE-b-80%PEO) nas soluções preparadas e utilizadas no processo de formulação das microcápsulas pela técnica de *Spray Drying*.

Considerando que este trabalho tem como objetivo obter partículas para utilização como suporte no processo de obtenção de biocombustíveis utilizando reatores assistidos por campo magnético, procura-se comparar as microcápsulas

obtidas pela técnica de *Spray Drying* com as microcápsulas preparadas pela técnica de coagulação que produz partículas maiores com uma provável maior retenção no reator assistido por campo magnético.

4.3.2 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROCÁPSULAS PREPARADAS COM A TECNICA DE *SPRAY DRYING*.

As microcápsulas de quitosana contendo um núcleo de magnetita apresentam um formato esférico e aspecto superficial enrugado (Figura 75).

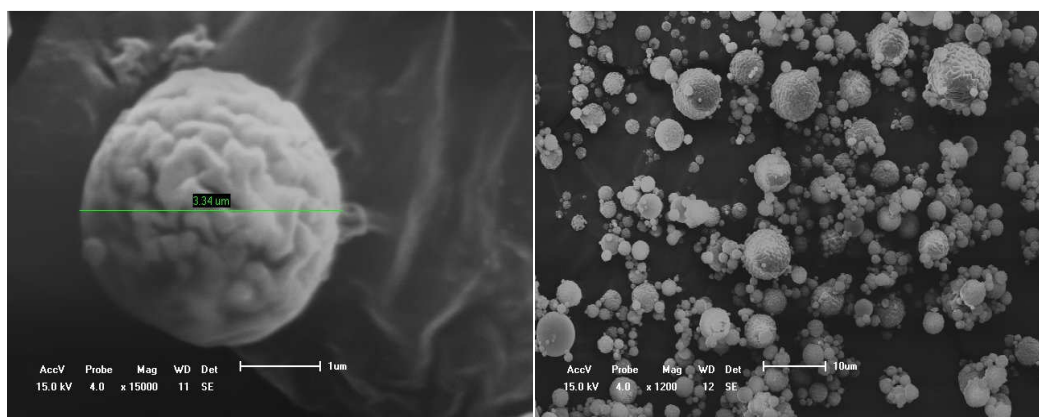


Figura 75 - Micrografia eletrônica de varredura das microcápsulas Q/Fe₃O₄

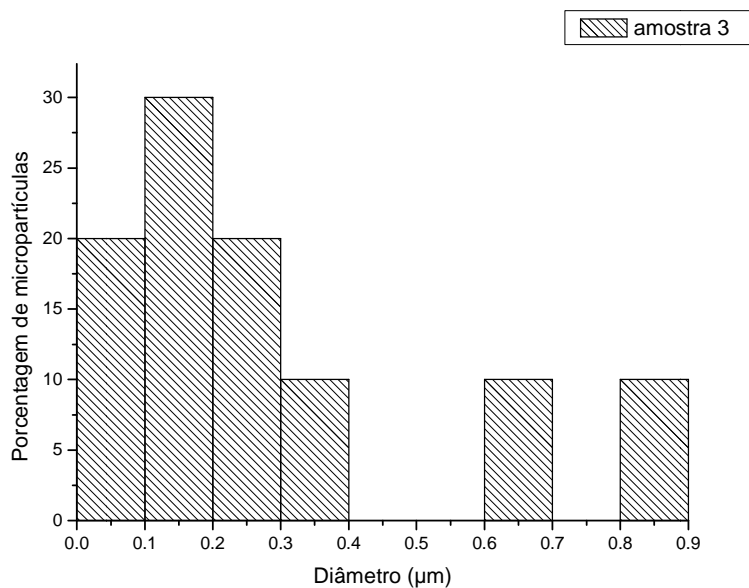


Figura 76 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas – Q/ Fe_3O_4

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 (Figura 76) indica que a maior fração de partículas (29%) das microcápsulas possuem diâmetro médio de 0,15 μm e menos do 20% com diâmetros entre 0,6 - 0,9 μm .

Estas microcápsulas magnéticas são formuladas com o objetivo de imobilizar a enzima covalentemente, entretanto foi avaliada a alternativa de imobilização por encapsulamento e a quitosana foi modificada utilizando trifosfato de sódio, FTP, (Figura 77).

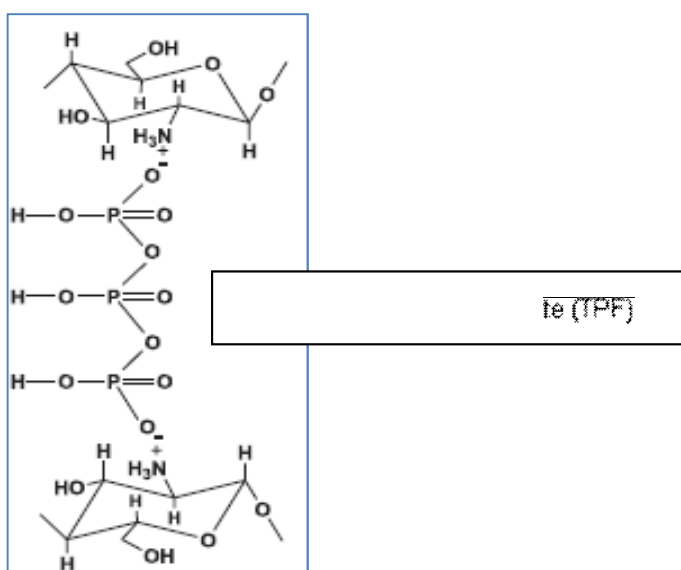


Figura 77 - Modificação da quitosana com trifosfato de sódio (TPF)

As microcápsulas de Q/TPF/ Fe_3O_4 mostrada na Figura 78, apresentaram uma maior rugosidade que as de Q/ Fe_3O_4 e tem formato esférico.

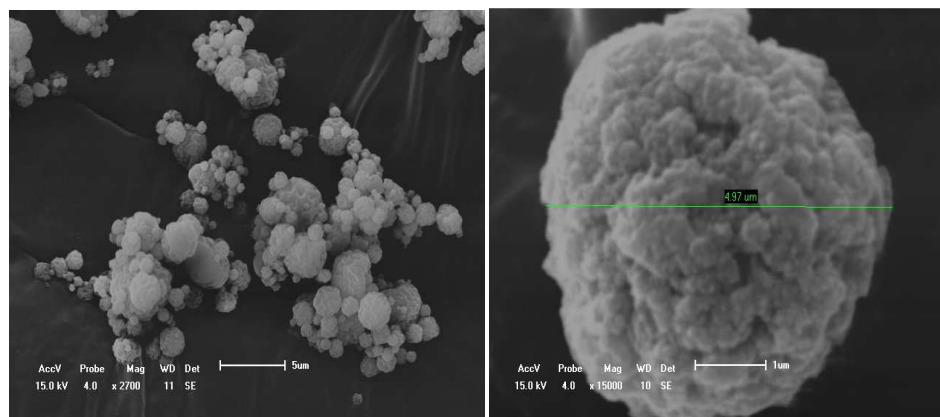


Figura 78- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4 .

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/TPF/ Fe_3O_4 (Figura 79), apresenta-se mais larga que para a Q/ Fe_3O_4 28% das microcápsulas se localizam abaixo de $0,25\mu\text{m}$ e (cerca de 50% em cada faixa) e as restantes entre $0,3$ e $0,55\mu\text{m}$.

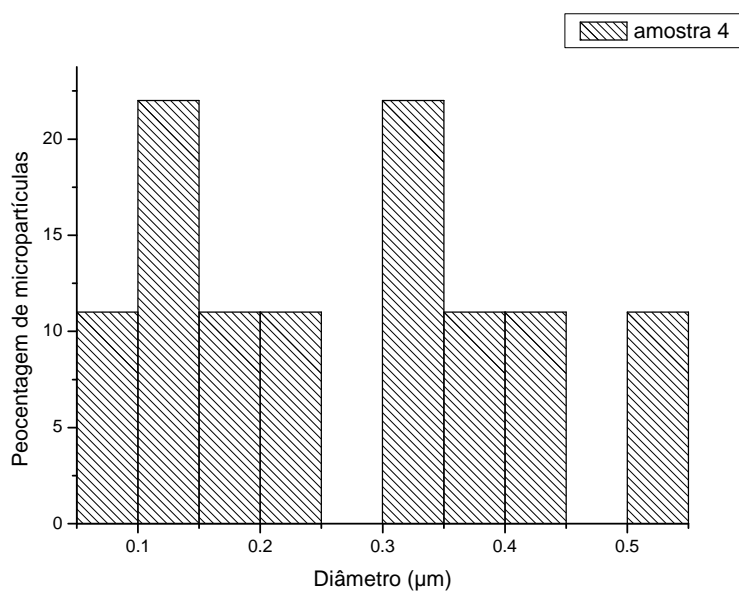


Figura 79 -Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/TPF/ Fe_3O_4 .

As microcápsulas formuladas com a blenda Q/PEO (Figura 80) apresentam uma morfologia na que se apreciam ondulações irregulares efeito que pode estar associada com a baixa temperatura de fusão do PEO, inferior a temperatura utilizada no dispersor do *Spray Drier* (135 °C).

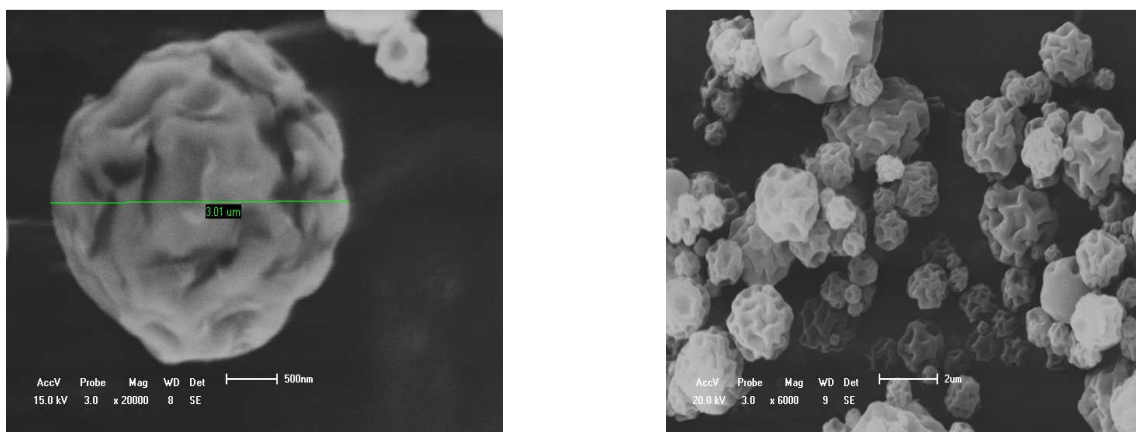


Figura 80 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das micropartículas Q/PEO/Fe₃O₄

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/PEO/ Fe₃O₄ (Figura 81), se caracterizam por uma distribuição diferenciada na que o 60% das microcápsulas se localizam a 0,15, 0,35 e 0,55μm.

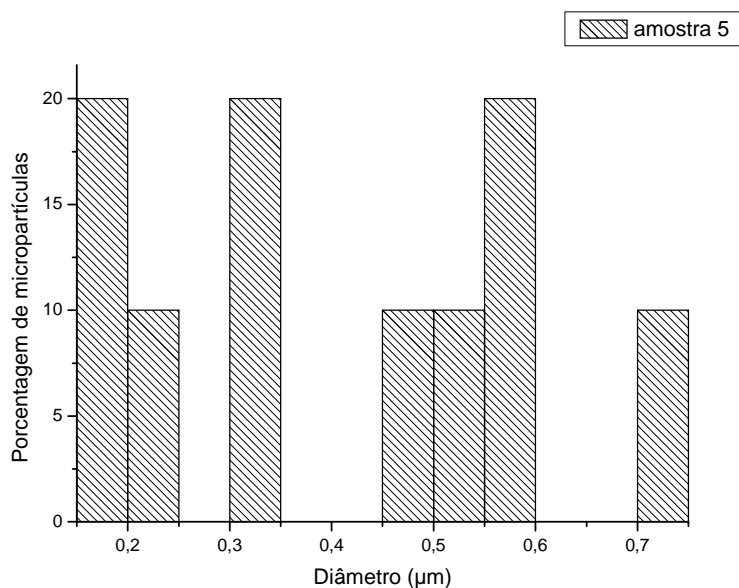


Figura 81-Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/PEO/ Fe₃O₄

As microcápsulas da blenda Q/PE-b-80%PEO (Figura 82) apresentam também uma morfologia na que se apreciam ondulações irregulares o que igualmente associamos a sua baixa temperatura de fusão (54 °C).

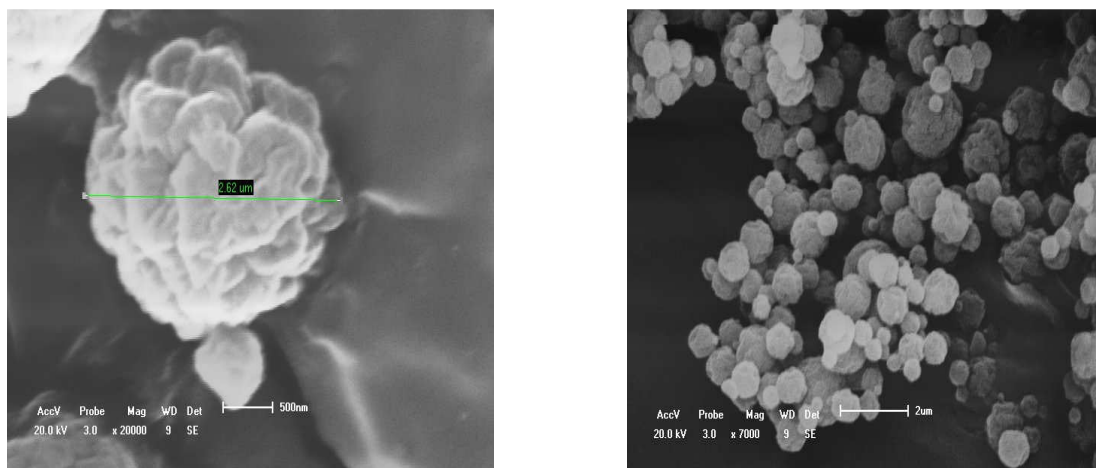


Figura 82- Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/Fe₃O₄

A distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/PE-b-PEO80%/ Fe₃O₄ (Figura 83), apresentam a maior regularidade de tamanho das formulações estudadas, localizando entre 0,1 e 0,4 μm 80% da microcápsulas.

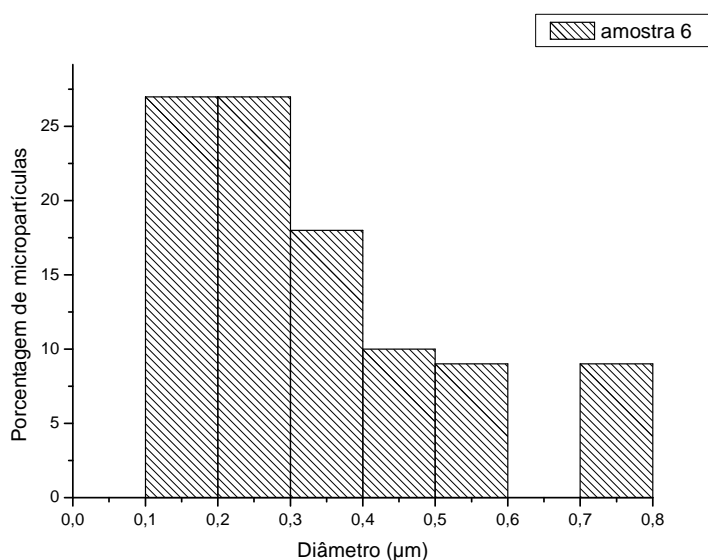


Figura 83 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO80/Fe₃O₄.

As microcápsulas de Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4 mostrada na Figura 84 apresenta uma rugosidade suave pouco expressiva. Este resultado é coerente com aqueles obtidos com as blendas de Q/ PE-b-PEO-COOH através da microscopia de força atômica, onde a quantidade de PEO adicionada à solução interfere de forma significativa na rugosidade.

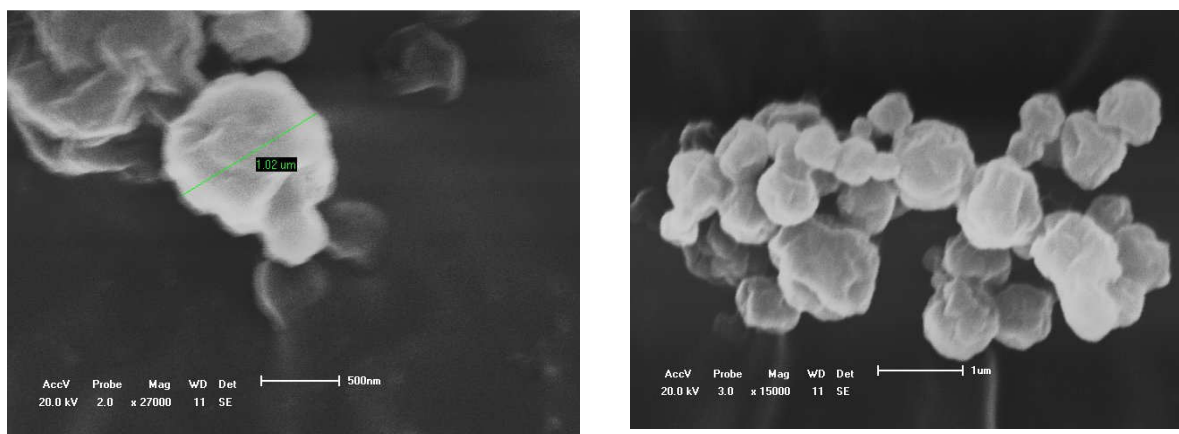


Figura 84 - Micrografia eletrônica de varredura da morfologia das microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4

A Figura 85, apresenta o histograma de distribuição de tamanho das microcápsulas de Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4 , evidenciando que 23% das microcápsulas possuem tamanho de aproximadamente 0,3 μm .

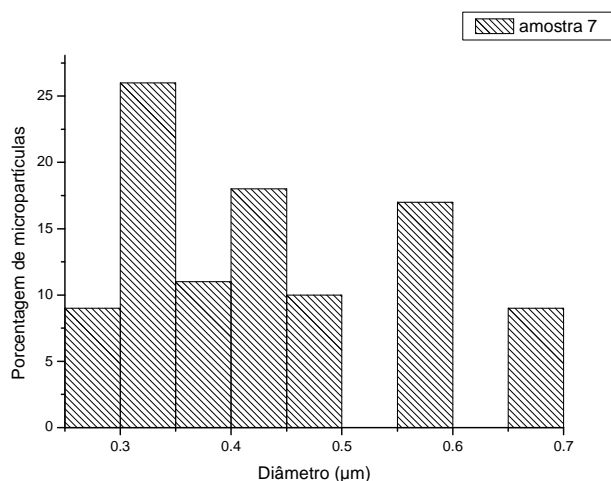


Figura 85 - Gráfico de distribuição de tamanho de microcápsulas Q/ PE-b-PEO-COOH/ Fe_3O_4

A microcápsulas de Q/TPF/ Fe₃O₄ possuem grande parte da distribuição de tamanho entre 0,3 e 0,55 µm, isto mostra que a adição do TPF como reticulante provocou um aumento na porosidade da quitosana, bem como um possível aumento na área superficial dos poros.

4.3.2 – POROSIDADE

Para a quitosana e suas blendas, a porosidade pode ser influenciada pela rota de preparação e as variáveis dos processos de formulação. Na etapa de preparação, os parâmetros mais importantes foram a concentração da solução de quitosana e a concentração da solução de NaOH (Beppu e Santana, 1999).

Através do método BET para análise de porosidade, foram obtidas as curvas isotermas dos processos de adsorção e dessorção de nitrogênio para as microcápsulas de Q/ Fe₃O₄ os resultados obtidos são apresentados na Figura 86.

Empregando modelos matemáticos associados ao método BET, foram obtidos os dados referentes à isoterma das microcápsulas. Estes dados foram fornecidos pelo software *Quantachrome Corporation* e são relacionados na Tabela 9.

Tabela 9 - Dados de volume e área superficial para as microcápsulas.

<i>Micropartícula</i>	<i>Área superficial</i>	<i>Volume dos poros</i>	<i>Diâmetro de poro (adsorção)</i>	<i>Diâmetro de poro (dessorção).</i>
Q/ Fe ₃ O ₄	2,3 m ² /g	1,22 x 10 ⁻² cm ³ /g	16,16 Å	18,02 Å
Q-TPF/ Fe ₃ O ₄	3,18 m ² /g	1,65 x 10 ⁻² cm ³ /g	19,49 Å	28,89 Å

Na Figura 86 é apresentado o gráfico com a curva de distribuição de porosidade destas microcápsulas de Q/Fe₃O₄ com propriedades magnéticas. Observa-se que os poros têm sua distribuição em duas regiões distintas, entre 20-50 Å e 50 - 2000 Å.

A partir dos resultados é visto que o tamanho dos poros por adsorção é menor que os poros de dessorção, indicando que o material apresenta rugosidade.

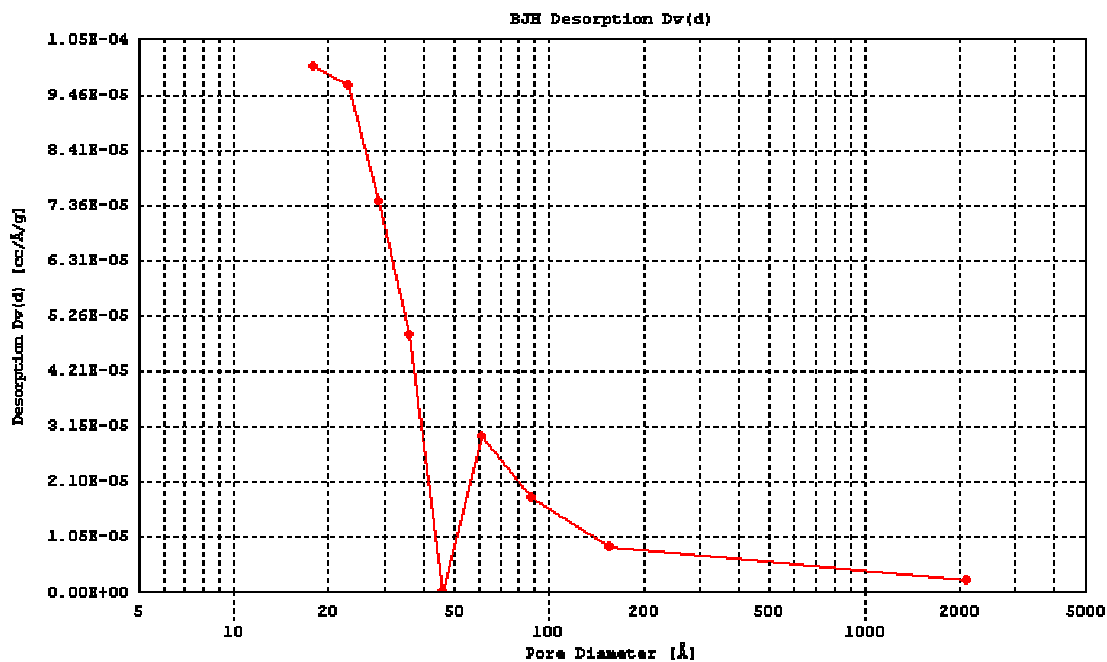


Figura 86 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/Fe₃O₄

Para as microcápsulas de Q/TPF/Fe₃O₄ é possível observar através da Figura 86 uma histerese não significativa entre as curvas de adsorção e dessorção, ou seja, os valores de pressão relativa e volume tiveram pequenas variações, isto acontece com poros pouco arredondados.

A histerese está associada à da morfologia dos poros e a adição de TPF propiciou a mudança na morfologia das microcápsulas tornando a largura da histerese muito próxima de zero.

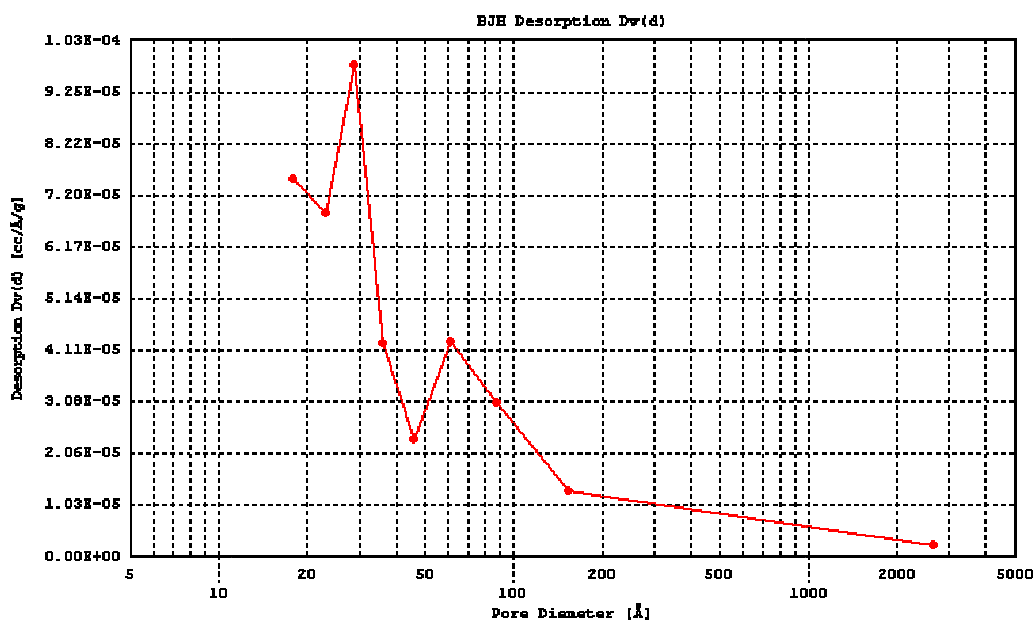


Figura 87 - Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para Distribuição do tamanho de poros por adsorção de nitrogênio para de Q/TPF/Fe₃O₄

A partir da Tabela 9 pode-se afirmar que para as microcápsulas reticuladas com TPF, houve um aumento significativo no diâmetro dos poros, com destaque para a dessorção indicando que uma quantidade maior de nitrogênio penetrou nas micropátículas, o que significa uma maior rugosidade nas microcápsulas.

A Figura 87 apresenta o gráfico da distribuição de porosidade destas partículas com propriedades magnéticas. Observa-se que os poros tem sua distribuição em duas regiões distintas, entre 18-45 Å e 45 - 2700 Å

Para as microcápsulas de quitosana reticulada com TPF, houve uma mudança na morfologia dos poros, no entanto, houve um aumento na porosidade, uma vez que o volume dos poros por dessorção aumentou consideravelmente em torno de 50% do volume de poros por dessorção para microcápsulas de quitosana pura.

As microcápsulas apresentaram valores elevados de poros de adsorção e dessorção, isto caracteriza o material como rugoso. É importante ressaltar que, dos fatores que podem influenciar na porosidade a modificação química da quitosana com o TPF, foi o fator que modificou a morfologia dos poros.

4.4 – MICROCÁPSULAS MAGNÉTICAS DE QUITOSANA FORMULADAS PELA TÉCNICA DE COAGULAÇÃO

4.4.1 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO.

A quitosana e a blenda de Q/PEO apresentaram maiores diferença em suas propriedades devido isto, estas foram utilizadas para obter as microcápsulas Q/Fe₃O₄ e Q-PEO/Fe₃O₄ (Figura 88) pela técnica de coagulação procurando incorporar uma maior quantidade de magnetita no núcleo das microcápsulas de forma que torne o suporte mais efetivo num processo em reator de campo magnético.

As microcápsulas de quitosana observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 88) apresentaram um formato esférico e uma superfície relativamente lisa quando utilizadas concentrações de quitosana acima de 2% m/m e mais porosa para concentrações de 2%.

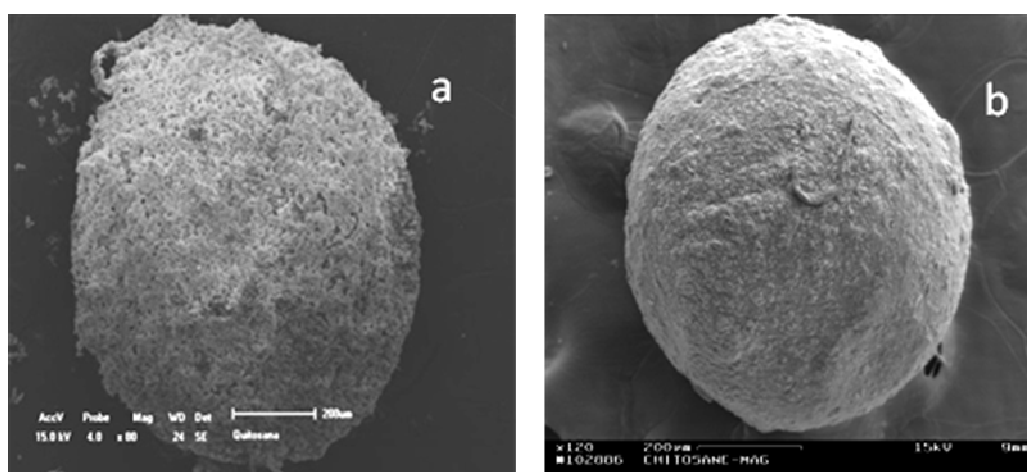


Figura 88 - Microcápsulas de Q/Fe₃O₄ (a) concentração 2% e (b) concentração 3%

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.

As microcápsulas de Q-PEO/ Fe_3O_4 observadas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 89) apresentaram um formato mais achatado e uma superfície rugosa quando utilizadas concentrações de quitosana iguais ou superiores a 2% m/m.

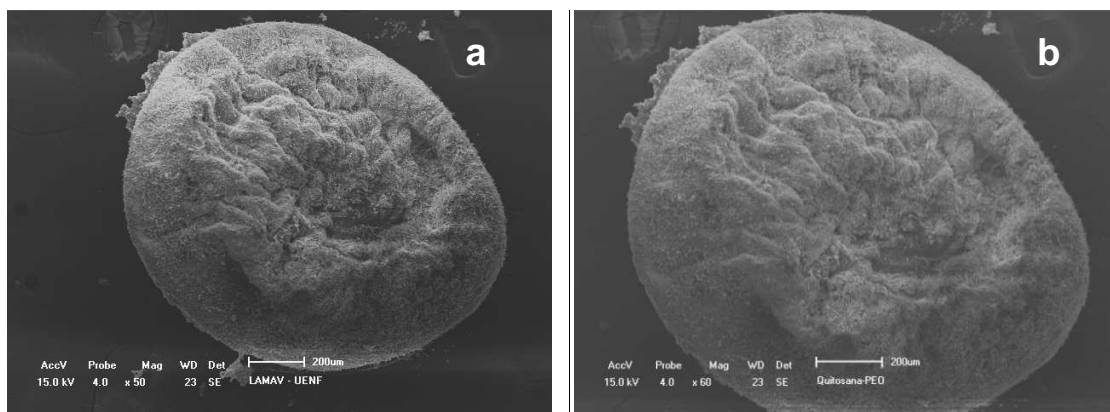


Figura 89 - Microcápsulas de Q/ Fe_3O_4 /PEO (a) concentração 2% e (b) concentração 3%

4.4.2 – ESTABILIDADE TÉRMICA E CARGA DE Fe_3O_4 NAS MICROCÁPSULAS.

Com o auxílio da termogravimetria (TGA/DTG) foi analisado o efeito da carga de magnetita na estabilidade da matriz e foi determinada a carga magnética, informação necessária para o análise do comportamento magnético do suporte.

A curvas de TGA/DTG (Figura 90) não indicam mudanças significativas na estabilidade da quitosana.

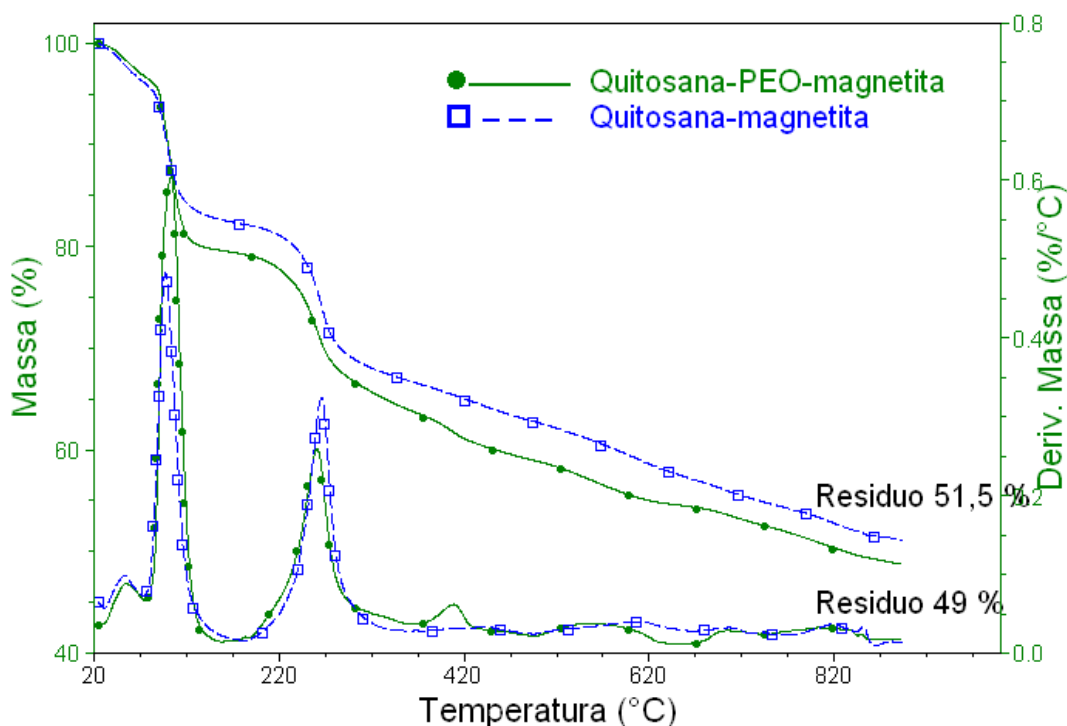


Figura 90 - Curvas termogravimétricas das microcápsulas magnéticas de quitosana e quitosana modificada com PEO.

O comportamento térmico observado para a quitosana se caracteriza basicamente pela presença de um pico a 54°C (5%) e a 96°C (15%) associados a perda da água. A segunda principal perda com taxa máxima a 267°C deve-se a decomposição (térmica e oxidativa), vaporização e eliminação de voláteis da quitosana.

De acordo com a literatura este processo de pirólise dos polissacarídeos se inicia com um processo de quebra randômica das ligações glicosídicas seguida da posterior decomposição com formação de ácido acético e ácidos graxos de baixa massa molar (C2, C3 e C6 principalmente).

As cargas de Fe_3O_4 de 51% e 49% para a quitosana e a blenda com PEO são comparáveis considerando o possível impacto nas propriedades magnéticas destes suportes.

As variações da massa a 54°C são atribuídas à perda de água em decorrência das ligações fracas existentes entre os grupos hidroxilas da água e os grupos amina da quitosana.

Rueda et al, (1999) constataram que a interação da água com os grupos hidroxila são mais fortes do que com os grupos amina e que a perda de água a 94°C esta associada a interação da água com os grupos hidroxilas.

As microcápsulas magnéticas de quitosana modificada com PEO apresentaram picos mais intensos (perdas maiores) na curva de DTG a 94°C o que é de esperar dado que existe uma maior contribuição de grupos hidroxilas na blenda devido a presença da fase PEO, responsáveis pela interação com a água.

4.4.3 – PROPRIEDADES MAGNÉTICAS DAS MICROCAPSULAS DE QUITOSANA E A BLENDAS COM PEO CONTENDO NÚCLEOS DE Fe_3O_4

O estudo da magnetização das microcápsulas (secas) foram realizados por magnetometria

As Figuras 91 e 92 mostram que as amostras apresentaram histerese negligível (próximo de campo zero), indicando um comportamento super paramagnético, e boa magnetização de saturação.

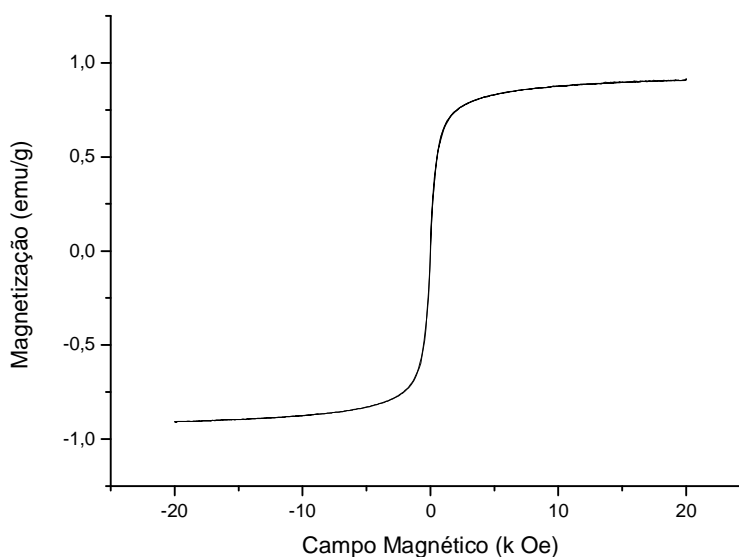


Figura 91 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/ Fe_3O_4

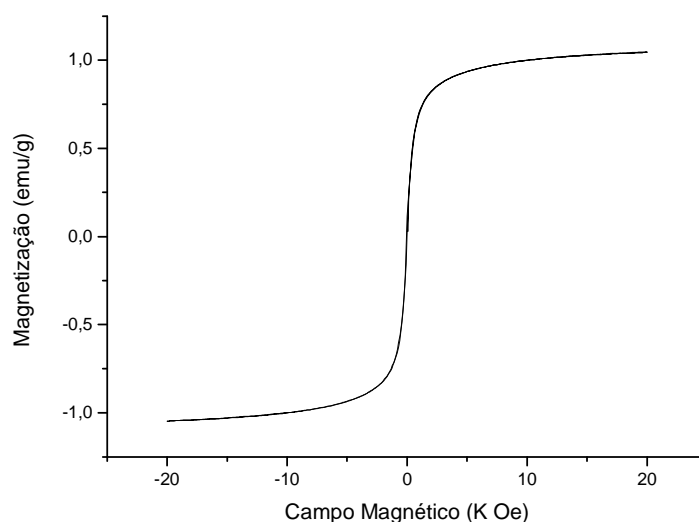


Figura 92 - Curva de magnetização para a microcápsula de Q/PEO/ Fe_3O_4 .

A ausência de histerese evidencia uma baixa coercividade caracterizando 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 ou indução residual. Em outras palavras, o material que foi influenciado pelo campo magnético não permaneceu magnetizado após a retirada do campo magnético.

Outro fato evidenciado pelas medidas magnéticas é que as interações entre as partículas foram pequenas, ou seja, uma partícula não interfere no comportamento magnético da outra.

As microcápsulas de quitosana modificada com PEO e magnetita apresentam maior magnetização de saturação, isto pode ser atribuído à incorporação do polímero nas microcápsulas magnéticas e também ao tamanho das partículas, uma vez que é relatado na literatura que partículas menores apresentam melhores resultados.

4.4.4 - FORMULAÇÃO DE UM BIOCATALISADOR. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA, ATIVIDADE CATALÍTICA.

As enzimas foram immobilizadas utilizando tanto o método de encapsulamento como covalentemente no suporte (Q/Fe₃O₄).

Para a imobilização covalente foi previamente tratado o suporte com uma solução de glutaraldeído. O agrupamento amino foi utilizado para formar uma ligação imínica com o glutaraldeído que a sua vez se liga covalentemente com a Lipase (Figura 93).

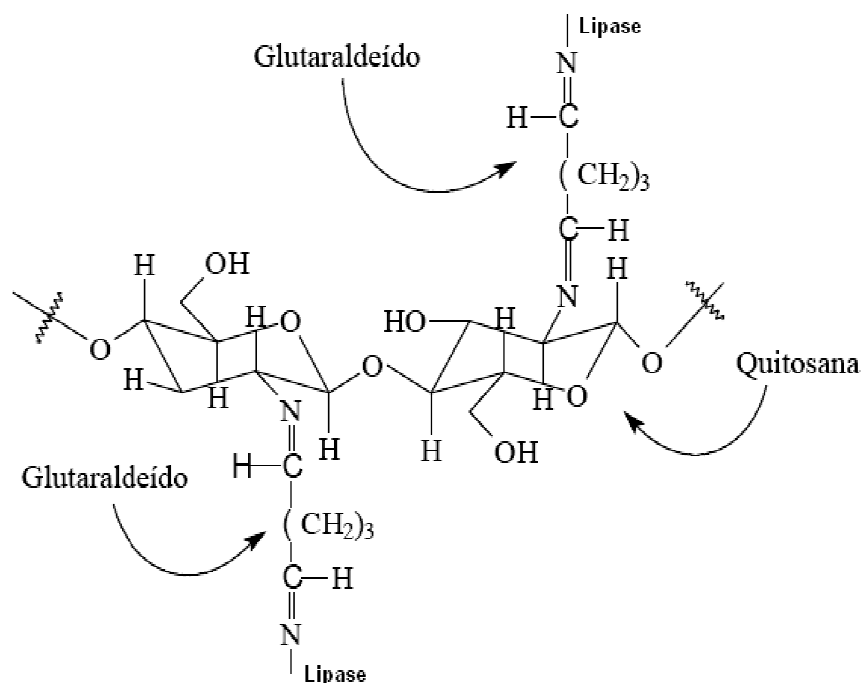


Figura 93 - Imobilização da Lipase no suporte de quitosana (Biochemical Eng. J. v.25, 15-23, 2005).

A imagem de MEV mostra o aspecto dos suportes após a imobilização covalente das enzima Lipase, na que a superfície das microcápsulas se mostram mais densas (Figura 94)

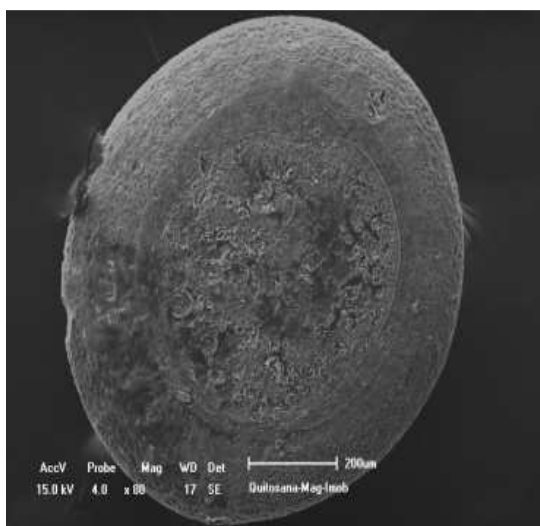


Figura 94 - Morfologia da microcápsula CS-Fe₃O₄-Gt-Lipase.

Resultados preliminares relativos a atividade hidrolítica da enzima (lipase) livre e imobilizada foram medidas utilizando uma emulsão do azeite de oliva, água e goma arábica. A quantidade de ácidos graxos livres liberados durante a hidrólise foi determinada pela titulação com solução de KOH.

A unidade de atividade da lipase (U) definida como a quantidade de enzima que catalisa a liberação de 1 mmol de ácido graxo do azeite por minuto nas condições de ensaio são apresentadas na Tabela 10 e 11.

Tabela 10 - Atividade Enzimática por adsorção física

<i>Derivados Imobilizados – adsorção física</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>	<i>Rendimento de Imobilização (%)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	304 U/g	12,45
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	252,7 U/g	10,35

Tabela 11 - Atividade Enzimática por ligação covalente

<i>Derivados Imobilizados – Ligação covalente</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>	<i>Rendimento de Imobilização (%)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	563,16 U/g	25,14
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	630,2 U/g	25,8

Nos suportes que foram imobilizados por adsorção física da Lipase, se observou uma atividade catalítica relativamente baixa para ambos os sistemas. O

menor rendimento do sistema Q-PEO/Fe₃O₄ parece estar associado a que os grupos hidroxilas terminais do PEO interagem na blenda preferencialmente com os grupos da quitosana formando ligações intermoleculares de hidrogênio ou que pode vir a diminuir a capacidade de imobilização do suporte.

A imobilização por adsorção física, em geral, apresenta baixos índices de rendimento por não haver nenhum tipo de ligação química entre suporte e a enzima.

As partículas Q/PEO/ Fe₃O₄ apresentaram uma baixa resistência mecânica e algumas se quebraram durante os tratamentos (agitação) ou que também contribuiu a diminuir o rendimento de imobilização.

A Tabela 12 mostra a atividade enzimática do sistema durante o período de imobilização, observa-se que tanto para as microcápsulas de Q/PEO/ Fe₃O₄ quanto Q/ Fe₃O₄ a diferença não foi significativa devido a uma baixa capacidade de adsorção da enzima ativa.

Tabela 12 - Atividade Enzimática das solução de imobilização durante o período de imobilização

<i>Derivados Imobilizados</i>	<i>Atividade do sobrenadante</i>	<i>Atividade (U/g seca)</i>
(Q/ Fe ₃ O ₄)	4 horas	1304
	24 horas	995,6
	Tampão de lavagem	26
(Q/PEO/ Fe ₃ O ₄)	4 horas	1960
	24 horas	1656
	Tampão de lavagem	54

CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES

- Os filmes de quitosana (80% acetilação) obtidos pela técnica de coagulação (80/20 m/m) apresentam baixa rugosidade (1.3 nm), 56,8 % de cristalinidade, temperatura de fusão em torno a 125°C e um coeficiente de permeabilidade ao vapor da água de $6,44 \times 10^{-7}$ Barrer, $4,89 \times 10^{-7}$ Barrer e $3,32 \times 10^{-7}$ Barrer , para as respectivas temperaturas 50°C, 55°C e 60°C.
- A adição de 20% m/m de PEO e dos copolímeros PE-b-80%PEO e PE-b-80%PEO-COOH à quitosana originou blendas homogêneas, miscíveis (AFM), com uma textura mais irregular e de maior rugosidade (60-93 nm) que o filme da quitosana. A adição do homopolímero e os copolímeros diminuíram a cristalinidade dos filmes em relação ao filme da quitosana (56,8%), principalmente na blenda com o copolímero PE-b-80%PEO-COOH (29% de fase cristalina). A temperatura de fusão da fase cristalina associada a quitosana apresentou uma leve diminuição nas blendas.
- Os filmes das blendas apresentaram permeabilidade inferior (mesma ordem de grandeza) ao filme da quitosana apesar de apresentar uma menor cristalinidade. Este comportamento foi justificado considerando a existência de interações entre os polímeros que formam a blenda o que originou uma modificação na interação do filme com o vapor da água e conseqüentemente no coeficiente de permeabilidade.
- Os filmes preparados com as blendas apresentaram capacidade térmica específica inferior que o filme da quitosana e os valores de difusividade térmica com valores crescentes nas blendas provavelmente associados a existência de domínio de maior mobilidade nas blendas como evidenciado no módulo de perda e na curva de tangente delta registrados nos ensaios de análise dinâmico mecânico.

- Os ensaios dinâmico mecânico (DMA), realizados com os filmes da quitosana e as blendas, mostram uma maior rigidez associada a quitosana a temperaturas acima de 10°C como consequência da formação de fase cristalina. Este fenômeno de cristalização se reduz nas blendas.
- Foram formuladas microcápsulas com a quitosana e as blendas objeto de estudo contendo entre 4-16% m/m de Fe_3O_4 em seu núcleo, utilizando a técnica de *spray drying* as quais apresentaram uma superfície rugosa, forma esférica e uma distribuição de tamanho de partícula entre 0,1-0,9 μm .
- Microcápsulas com a quitosana e a blenda Q/PEO foram formuladas com a técnica de coagulação considerando que estes sistemas apresentaram diferenças relevantes nas propriedades de transporte, rugosidade e cristalinidade entre outras quando formulados os filmes densos. As microcápsulas de quitosana e da blenda com PEO apresentaram um formato esférico com uma maior porosidade nas microcápsulas de quitosana.
- As distribuições de tamanho das microcápsulas são próximas, entre 400-600 μm na quitosana e entre 500-800 μm na blenda, ambas com carga de Fe_3O_4 próxima a 50% m/m.
- As propriedades magnéticas das microcápsulas, tanto para quitosana como para a blenda indicam que os suportes formulados têm uma rápida resposta quando aplicado um campo magnético. Os suportes Q/ Fe_3O_4 e Q/PEO/ Fe_3O_4 não permaneceram magnetizados após retirada do campo magnético. O suporte Q/PEO/ Fe_3O_4 apresentou uma magnetização (1,05 meu/g) maior que o suporte Q/ Fe_3O_4 .
- A imobilização da enzima lipase foi realizada utilizando os suportes Q/ Fe_3O_4 e Q/PEO/ Fe_3O_4 por adsorção física e covalentemente utilizando o glutaraldeído. Os testes preliminares de atividade hidrolítica da enzima indicaram uma maior atividade nas condições de análise para as enzimas imobilizadas covalentemente e quando utilizado o suporte Q/PEO/ Fe_3O_4 .

CAPÍTULO 6: REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCALDE, M., Ferrer, M., Plou, F. J., Ballesteros, A. *Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes*. TRENDS in Biotechnology, n.6, 2006, p.281-287.

ALVES, A. C., Cardoso, J. F., Almeida, M. A. P., Melo, C. K., Louzeiro, H. C. (2005) *Reaproveitamento de lipase imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu*. Biodiesel o Novo Combustível do Brasil, 2005, p. 85-89.

AMIJI, M. M. *Permeability and blood compatibility properties of chitosan – poly(ethylene oxide) blend membranes for haemodialyses*. Biomaterials, v.16. p.593-599, 1995.

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

ARCIDIACONO, S.; Kaplan, D.L. *Biotechnol. Bioeng.* 1992, 39, 281 – 286.

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

BORDE, B. et al. *Calorimetric analysis of the structural relaxation in partially hydrated amorphous polyssacarides I Glass transition and fragility*. Carbohydrate Polymers, v.48, p. 83-96, 2002.

BREITENBACH, A. Mohr D., Kissel T., (2000). *Biodegradable Semi-crystalline Comb Polyesters Influence the Microsphere Production by Means of a Supercritical Fluid Extraction Technique (ASES)*. Journal of Controlled Release 63, 53-68.

BRUGNEROTTO. J. et AL. *Na infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization*. Polymer, v.42, p. 3569-3580, 2001.

CAMARGO, F. A. *Obtenção, caracterização e estudo de biodegradação de blendas de poli(3-hidroxibutirato-co-valerato)/(PHBV) com lignina de bagaço de cana de açúcar*. Tese (Mestrado em Engenharia Química) – Campinas – SP, Universidade de Campinas – UNICAMP, 2003.

CANEVAROLO Jr., S. V. *Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros*. São Paulo: Artliber, 2002, p.184.

CARVALHO, Tecia Vieira., *Biomateriais à base de quitosana de camarão e bactérias para remoção de metais traços e petróleo* . Dissertação de mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

CASTILLO, T. E., *Biossíntese e Caracterização de um Elastômero Biodegradável a partir de Recursos Renováveis*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Tese de Doutorado, 2002, p. 68-70.

CASTRO, N., .A.Witt., A.T.Pires. *Preparação de blendas de quitosana/poli (álcool vinílico) reticuladas com H₂SO₄ para aplicação como condutores protônicos*. 2008, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Brasil.

CHANG, J., Xião, B., Chen, Y., Fu, Y., L, P., Wang, X. *Synthesis of biodiesel from waste cooking oil using immobilized lipase in fixed bed reactor*. Energy Conversion and Management, n. 50, 2009, p. 668-673.

CHEN. Xuesi, et al. *Miscibility studies of the blends of chitosan with some cellulose ethers*, Carbohydrate Polymers, 2005, p. 1-7.

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

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

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.

CYPRINANO, G.T.N. Membrans de quitosana macro e microporosa: preparo caracterização e permeabilidade. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN. 2008.

DALLAN, Paula Rulf Marreco. *Síntese e caracterização de membranas de quitosana para aplicação na regeneração de pele*, Tese de Doutorado, UNICAMP – Campinas, São Paulo, 2005.

DONADEL. K , M. D.V. Felisberto, V T. Fávere, M Rigoni, N. J. Batistela, M. C.M. Laranjeira. *Synthesis and characterization of the iron oxide magnetic particles coated with chitosan biopolymer*. Materials Science and Engineering C 28 (2008) 509–514.

DUARTE, E. L. *Estudo de Fases Termotrópicas por Microscopia Óptica, Medidas de Densidade, Entálpicas e Espalhamento de Raios X*, Dissertação de Mestrado, USP/IF, São Paulo, 2000.

DUARTE, M. L., et AL. *Na optimised method to determine the degree of acetylation of chitin and chitosan by FTIR spectroscopy*. Int. J. Biol. Macromol., v31, p. 1-8, 2002.

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

El-Hadi, A., Schanabel, R., Straube, E., Muller, G., Henning, S. *Correlation between degree of crystallinity, morphology, glass temperature, mechanical properties and biodegradation of poly (hydroxyalkanoate) PHAs and their blends. Polym. Test.*, v.21, p.665-674 (2002).

ELIGIO, T. C., Sánchez, R. *Characterization of poly (3-hydroxyalkanoate) chemically modified and its performance as matrix for hormone release. Die Angewandte Makromolekulare Chemie*, n. 270, 1999, p. 69-75.

ETTAYEBI, K., Yamani, J. E., Ettayebi, M., Jamai, L. *Production of ethanol from starch by free and immobilized Candida tropicalis in the presence of α -amylase. Bioresource Technology*, n. 98, 2007, p. 2765–2770.

FONTINELES. T.A., Souza.A A., C.M.L.,Silva.Cp., Moita Neto.J.M. *Interação entre polioxido etileno e quitosana.CBQ*, (2006).

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.

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.*

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

GILMORE, D. F., Fuller, R. C., Lenz, R., *“Biodegradations of Poly(Beta-Hydroxy Alkanoates), in Degradable Materials: Perspectives, Issues and Oppurtunities, Barenerg, S. A.; Brash, J. L.; Narayan, R., and Redpath, A. E., Eds. CRC Boston,pp. 481-514 (1990).*

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.

GUIMARÃES, A. F. X. S. *Catalisadores heterogéneos para a produção de biodiesel metanólise do Óleo de Soja sobre Hidrotalcites de Magnésio e Alumínio Modificadas*. Tese (Mestrado) – Instituto Superior Técnico Universidade Técnica de Lisboa – IST. 75p. Lisboa, 2007.

HIRANO, S. ; *Biotech. Ann. Res.* 1996, 2, 237 – 258.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail/ALDRICH/431079>.
[acesado em 10/05/2007](#).

HUANG, S. J., and Edelman, P. G., *An Overview of Biodegradable Polymers and Biodegradation of Polymers, in Degradable Polymers : Principles and Applications.*, Scott, G., and Gilead, D., Eds., Chapman & Hall, Chapter 2, p.18-28, (1995).

IKEJIMA. T., Y. Inoue. *Crystallization behavior and environmental biodegradability of the blend films of poly(3 – hydroxybutyric acid) with chitin and chitosan*, *Carbohydrate Polymers*, 2000,vol. 41, p. 351-356.

ISO, M., Chen, B., Eguchi, M., Kudo, T., Shrestha, S. *Production of biodiesel fuel from triglycerides and alcohol using immobilized lipase*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 16, 2001, p. 53–58.

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.

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.

LEITE, H. M. E. *Formulação e Caracterização de Matrizes de Polihidroxibutirato para Liberação Controlada de Fármacos*, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Tese de Mestrado, 2004, p.20.

LIMA, I. , Emerson S. Ribeiro e Claudio Airoidi. *O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno*. *Quim. Nova*, Vol. 29, No. 3, 501-506, 2006.

LIMA, Ilauro de Souza. *Quitossanas, quitosana química e quitossanas morfologicamente modificadas com anidrido succínico: propriedades, adsorção e termoquímica.*, Tese (Doutorado em Química Inorgânica) – Campinas – SP, Universidade de Campinas – UNICAMP.

LIU, C., Wang, F., Ou-Yang, F. *Ethanol fermentation in a magnetically fluidized bed reactor with immobilized Saccharomyces cerevisiae in magnetic particles*. *Bioresource Technology*, n. 100, 2009, p. 878–882.

LOPEZ, F.E, et al. *A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan*. *J.Therm. Anal.Cal.* v.91.p633-639. 2008.

LUCAS, E. F., Soares, B. G., Monteiro, E. *Caracterização de Polímeros: Determinação de Peso molecular e Análise Térmica*, Rio de Janeiro: E-papers, 2001, p. 366.

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

MADDEVER, W. J., and Campbell, P. D., “*Modified Starch Based Environmentally Degradable Plastics*,” in *Degradable Materials: Perspectives, Issues and Opportunities*, Barengerg, S. A.; Brash, J. L.; Narayan, R., and Redpath, A. E., Eds. CRC Boston, pp. 237-262 (1990).

MAJETI, N.V., Kumar R., *A review of chitin and chitosan applications*, *Reactive & Functional Polymers*, 2000, vol.46, p.1-27.

MASSON, J. F., and Manley, R. St. John, "Solid-state NMR of some cellulose/synthetic polymer blends". *Macromolecules.*, v.25,589-592 (1992).

MINTEER, S. D., Cooney, M., Sjöholm, K. H. *Effects of degree of deacetylation on enzyme immobilization in hydrophobically modified chitosan.* Carbohydrate Polymers, n. 77, 2009, p. 420–424.

MURAT, Y. E. *Encapsulation of urease enzyme in xanthan-alginate spheres.* Biomateriol, n. 16, 1995, p.157-1161.

MUZZARELLI, R. A. A.; et al. *Polimeri in Medicina*, XX Convegno-Scuola, Associazione Italiana di Scienza e Tecnologia delle Macromolecole, Villa Fetrinelli, 1997, 307 – 336.

NASCIMENTO, M. G., Soldi, V., Dalla-Vecchia, R. *Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros.* Química Nova, v. 4, n. 27, 2004, p. 623-630.

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

NUNES, S. P. e Inoue, T., *Evidence for spinodal decomposition and nucleation and growth mechanisms during membrane formation,* *J. Membrane Sci.*, v.111, p.93-103 (1996).

OLIVEIRA, L. G., Mantovani, S. M. *Transformações biológicas: Contribuições e perspectivas.* Química Nova, n.3, 2009, p.742-756.

ORNUM, J. V. *Infofish Int.* 1992, 6, 48 – 52.

PARIZE ,A. L. , Hellen K. Stulzer, Mauro C. M. Laranjeira, Inês M. C. Brighente. Tereza C. R. S. Desenvolvimento de Microcápsulas de Quitosana contendo Cúrcuma pelo método de Spray Drying e Reticuladas com Tripolifostato de Sódio.

Anais do 10o Congresso Brasileiro de Polímeros – Foz do Iguaçu, PR – Outubro/2009

PETER, M. G.; J.M.S. – *Pure Appl. Chem.* 1995, 4, 629 – 640.

POLEY, L. H.D.,(2003) *Aplicações de técnicas fototérmicas ao estudo de propriedades físicas de polímeros biodegradáveis*. Tese (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais) Campos dos Goytacazes – Rj. Universidade Estadual do Norte Fluminense, 101p.

POUTON, C. W., Akhtar, S. *Biosynthetic polyhydroxyalkanoates and their potential in drug delivery*, *Adv. Drug Deliver. Rev.*, v.18; p.133-162 (1996).

PRAPAGDEE. B. et al. *The role of chitosan in protection of soybean from sudden death syndrome caused by fusarium solani f. SP. Glycines*. *Bioresour Technol.*,v98, p.1353=1358, 2007.

PRASHANTH, K. V. H. ; Tharanathan. R. N. *solid state structure of chitosan prepared under different N-deacetylating conditions*. *Carbohydr. Polym*, v.50, p.27-33, 2002.

RAMPIN, M. A., Hurtado, C. R., Dabdoub, M. J. *Síntese de Ésteres etílicos a partir de óleos vegetais utilizando lípase imobilizada de Thermomices lanuginosus*. Reunião Anual Sociedade Brasileira de Química 29, Àguas de Lindóia-São Paulo, 2006.

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.

RIM, J. W. et AL. *Preparation and characterization of chitosan-based nanocomposite films with antimicrobial activity*. *J.Agric. Food Chem.* V54, p.5814-5822.2006.

RITTHIDEJ, G. C., Phaechamud, T., & Koizumi, T. *Moist heat treatment*

on physicochemical change of chitosan salt films. International Journal of Pharmaceutics, 232, 11–22. 2002.

ROY, René., et al. *Chemical Modification of Chitosan. 10. Synthesis of Dendromized Chitosan – Sialic Acid Hybrid Using Convergent Grafting of Preassembled Dendrons Built of Gallic Acid and Tri(ethylene glycol) Backbone,* Macromolecules, 2001, Vol. 34, 3905 – 3909.

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.

SÁNCHEZ, R., Galego N. *Characterization and application of poly- β -hydroxialkanoates family as composite biomaterials.* Polymer Testing, n. 19:485-492.

SÁNCHEZ, R., Galego N. *Physical and functional characterization of PHAscl membranes.* Polymer, n. 43, 2002, p. 3109-3114.

SÁNCHEZ, R., Martin, M., Miguens, F., Rieumont, J. *Morphological study of polymeric microparticles obtained by oil-water emulsion by SEM.* Acta Microscopica, n.6, 1997, p.288.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G. Vargas, H. *Photoacoustic Monitoring of Internal Plastication in Poly (3-hydroxybutirate-co-hydroxyvalerate) Copolymers: Measurements of Thermal Parameters.* Journal Braz Chem Soc, n. 10, 1999, p. 97-103.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G., Sthel, M., Gonçalves, S. S., Schramn, D. U., Briones, J. R., Vargas, H. *Characterization of Poly-3-hydroxy octanoate using Photothermal Methods.* Review of Scientific Instruments, Estados Unidos, n.74, 2003, p.831-833.

SÁNCHEZ, R., Silva, M. G., Vargas, H., Siqueira, M. O., Poley, L. H. *Water and*

vapors permeability at different temperatures of poly-3-hydroxybutyrane dense membranes. *Polímeros - Ciência e Tecnologia*, n.15, 2004, p.22-26.

SASHIWA, Hitoshi, Sei-ichi Aiba. *Chemically modified chitin and chitosan as biomaterial*, *Progress in Polymer Science*, 2004, vol. 29, p.887-908.

SASHIWA, Hitoshi., et al. *Highly Convergent Synthesis of Dendrimed Chitosan – Sialic Acid Hybrid*, *Macromolecules*, 2001, Vol. 34, 3211 – 3214.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa. *Chemical modification of chitin and chitosan 2: preparation and water soluble property of N-acylated or N-alkylated partially deacetylated chitins*, *Carbohydrate Polymers*, 1999, vol. 39, p. 127-138.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., R. Roy. *Chemical modification of chitosan. Part 9: Reaction of N-carboxyethylchitosan methyl Ester with diamines of acetal ending PAMAM dendrimers*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 47, p. 201-208.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., René Roy. *Chemical modification of chitosan 11: chitosan hybrid as tree like molecule*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 49, p. 195-205.

SASHIWA, Hitoshi., Y. Shigemasa., René Roy. *Chemical modification of chitosan 8: preparation chitosan - dendrimer hybrid via short spacer*, *Carbohydrate Polymers*, 2002, vol. 47, p. 191-199.

SELLIN, N., (2002) *Análise da Superfície de Polímeros Pós-Tratamento Corona*. Tese (Doutorado em Engenharia Química) 78p.

SIGNINI, R.e Campana filho, S.P. *Características e propriedades de quitosanas purificadas nas formas neutra, acetato e cloridrato*. *Polímeros*, v.11, n.2, São Carlos, 2001.

STROPNIK, C., Germic, L. e Zerjal, B., *Morphology variety and formation mechanisms of polymeric membranes prepared by wet phase inversion*. *J. Appl. Polym. Sci.*, v.61, p.1821-1830(1996).

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

TAN, T., Wang, F., Xie, F., Nie, K., Lu, J. *Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized Candida sp.* 99-125. *Process Biochemistry*, n. 42, 2007, p. 1367–1370.

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

Ullmann'sa Eyclopedia of Industrial Chemistry. 5th Edition, VCH: Germany, v.A16, p.187-258 (1986).

Ullmann'sb Eyclopedia of Industrial Chemistry. 5th Edition, VCH: Germany, v.A21, p.273-304(1986).

UTRACKI, L. A., *Introduction to Polymer Alloys and Blends e Polymer- Polymer Miscibility in "Polymer Alloy and Blends: Thermodynamics and Rheology"*, Hanser Publishers, New York, (1990).

UTRACKI, L.A., *Polymer Alloys and Blends*, Handbook of Polymer Science and Technology, ed. Nicholas P. Cheremisinoff, New York, v.4 p.121-202, (1989).

UTRACKI, L.A., *Polymer Alloys and Blends-Thermodynamics and Rheology*; Munich, Carl Hanser Verlag Publishers, (1989).

VERHOOGT, H., Ramsay, B. A., Favis, B. D. *Polymer Blends containing poly(3-hydroxybutarate)*. *Polymer*, v.35, no 24, p 5155-5169 (1994).

WU, W., Chiou, S., Giridhar, R., Hung, T. *Binary immobilization of Candida rugosa lipase on chitosan*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, n. 26, 2003, p. 69–78.

XI-Guang Chen, Cheng-Sheng Liu, Chen-Guang Liu, Xiang-Hong Meng, Chong M. Lee, Hyun-Jin Park. *Preparation and biocompatibility of chitosan microcarriers as biomaterial*, *Biochemical Engineering Journal* 2006, vol. 27, p. 269–274.

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.

ZHANG, M.; Li, X.H.; Gong, Y.D.; Zhao, N.M. e Zhang, X.F. *Properties and biocompatibility of chitosan films modified by blending with PEG*. *Biomaterials*, v.23, p.2641-2648, 2002.

ZONG, M., Wu, H., Li, N. *Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from Penicillium expansum*. *Process Biochemistry*, n. 44, 2009, p. 685–688.