

Josamaique Gilson Venerai

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA) EM
REATOR DE LEITO EMPACOTADO UTILIZANDO FLUIDO
PRESSURIZADO**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de alimentos. Área de concentração: Desenvolvimento de processos na Indústria de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Sandra Regina Salvador Ferreira

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Venerai, Josamaique Gilson
PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLI(?-CAPROLACTONA) EM REATOR
DE LEITO EMPACOTADO UTILIZANDO FLUIDO PRESSURIZADO /
Josamaique Gilson Venerai ; orientador, José Vladimir de
Oliveira ; coorientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira.
- Florianópolis, SC, 2014.
201 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos.

Inclui referências

1. Engenharia de Alimentos. 2. e-ROP de PCL. 3. PER. 4.
Fluidos pressurizados. 5. Novosym 435. I. Oliveira, José
Vladimir de. II. Ferreira, Sandra Regina Salvador. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-
Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Ata de aprovação da banca

“Se fui capaz de ver mais longe,
foi porque me apoiei em ombros
de gigantes”.

Sir Isaac Newton (1642 – 1727)

Dedico este Trabalho primeiramente a **DEUS**, o único digno de toda honra e toda glória e em seguida a minha amada família por me ensinarem que gestos e atitudes, dizem mais do que palavras.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por tornar tudo possível em minha jornada. Á este, obrigado por tudo que foi, é e ainda será em minha vida.

De forma especial os meus pais Alaides e Irma Correia, pelo apoio, incentivo e amor incondicional.

Aos meus orientadores José Vladimir de Oliveira e Sandra Regina Salvador Ferreira por sua paciência, dedicação, generosidade em compartilhar parte do seu conhecimento e pelas personalidades cativantes que têm me permitido conhecer em si. Razões pelas quais, a cada dia mais os prezo e admiro!

Ao estagiário de iniciação científica e amigo, Diego Dantas pelo empenho e dedicação na realização dos experimentos.

Aos colegas de Doutorado e do Lab. LATESC com quem partilhei discussões e experiências e compartilho minha amizade.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal de Santa Catarina, a Universidade regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões e ao PGEAL pela disponibilização da estrutura física e apoio para realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito da arte da natureza consiste na habilidade de tecer complexidade a partir de simplicidade, ligando moléculas pequenas, móveis e facilmente transportáveis, em cadeias e redes. As moléculas resultantes, ou polímeros, são fibras, folhas e blocos que conhecemos na forma de borracha, seda, cabelo, lã. Os químicos procuram compreender e imitar a natureza neste processo e em muitas outras situações e têm conseguido, no caso de algumas substâncias, uma imitação tolerável. Em outras circunstâncias, eles superaram a natureza ao projetar moléculas para propósitos especiais. Atualmente, os polímeros não apenas brotam da pele na forma de cabelo e lã e exsudam de insetos como seda, mas também são transportados em caminhões de carga das fábricas na forma de plásticos, têxteis e revestimentos.

(Peter Atkins, 2000)

RESUMO

A crescente demanda por materiais poliméricos livres de resíduos tóxicos, oriunda dos setores médico, farmacêutico e alimentício, bem como os avanços tecnológicos na obtenção de enzimas como as lipases solvante tolerantes e/ou imobilizadas, permitindo sua reutilização tornou possível que, catalisadores biológicos e fluidos pressurizados outrora relegados a segundo plano, tornassem-se atualmente uma das alternativas mais promissoras na área de polímeros biorreabsorvíveis e biodegradáveis. Neste contexto, a policaprolactona (PCL), um polímero biorreabsorvível e biodegradável, bem como o dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) têm permeado, de forma separada ou conjunta, diversas áreas de interesse acadêmico e industrial, com aplicações nos setores biomédico, farmacêutico, alimentício, e ecológico. Da combinação destas tecnologias aliada à possibilidade de produção em larga escala de polímeros via sistemas contínuos, emerge um vasto território de possibilidades/oportunidades para o setor acadêmico e industrial. Neste contexto, o presente trabalho objetivou o estudo da polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP) da ϵ -caprolactona (ϵ -CL) em fluidos pressurizados pelo uso de um reator contínuo empacotado (PBR) com enzimas imobilizadas (Novozym 435), visando a definição das melhores condições para as reações de polimerização. Para tanto, inicialmente foram realizados experimentos em dióxido de carbono (CO₂) de forma a avaliar a influência da pressão de operação (120 e 200 bar), da razão mássica solvante/monômero (S/M = 2:1 e 1:2) e dos diferentes tempos espaciais (τ) do substrato dentro do PBR sobre o rendimento das reações (Y), massa molecular numérica média (M_n) e índice de polidispersão (IP). Este estudo também avaliou a produção de policaprolactona para longos tempos de reação com a mesma carga de enzimas, visando determinar a retenção da atividade enzimática por meio da constância nos valores das variáveis de resposta das reações de e-ROP (Y, M_n e IP). Os melhores resultados obtidos a partir destes experimentos iniciais foram de 60,1 % e 53,5 % de conversão monomérica (Y) e de 21700 Da e 35800 Da de massa molecular numérica (M_n) para os experimentos realizados com razão S/M de 2:1 e pressões de 120 e 200 bar respectivamente. No entanto, estes valores de Y e M_n diminuíram rápida e expressivamente com o processamento contínuo dos reagentes devido ao acúmulo/adsorção de material polimérico sobre as enzimas. A partir destes resultados optou-se pelo uso de um solvente orgânico (diclorometano-DCM) como

cossolvente para reações de polimerização com as melhores condições operacionais obtidas anteriormente. Neste sentido, o uso do DCM como cossolvente nas reações mostrou-se promissor resultando em altos valores de Y (93,3 %) e valores de M_n de cerca de 22500 Da para tempos espaciais de apenas 15 minutos em reações realizadas a 120 bar e razão S/MIX (MIX = 50 % de ϵ -CL + 50 % de DCM). Além disso, os valores de Y permaneceram constantes até 6 τ (90 min.), já os valores de M_n foram menos constantes. A partir destes resultados, diversas variáveis foram testadas visando melhorar a eficiência na produção de policaprolactona em sistema contínuo como: quantidade de água no meio reacional, tipo e concentração de cossolvente no meio, uso de ondas ultrassônicas nas reações de e-ROP e uso de n-butano como solvente pressurizado. Neste sentido rendimentos de até 98 % e massas moleculares (M_n) na faixa de 35000 (Da) foram obtidos. Algumas das melhores condições operacionais obtidas a partir destes experimentos foram utilizadas em reações de e-ROP realizadas para até 40 τ (10 h de reação) usando a mesma carga de enzimas. Esta etapa resultou em valores de Y de 95,0 % e massas moleculares (M_n) de 20000 (Da), estes valores máximos mantiveram-se constantes por até 10 horas de reação com a mesma carga de enzimas. A partir dos resultados obtidos conclui-se que, tanto o equipamento quanto a metodologia desenvolvida no presente trabalho para a produção de PCL em modo contínuo mostraram-se promissores na busca por polímeros de alto valor agregado.

Palavras-chave: e-ROP, ϵ -caprolactona, Novozym 435, dióxido de carbono, PBR.

ABSTRACT

The rising demand for products free of toxic waste coming from the medical sectors, pharmaceutical and food industries, as well as technological advances in obtaining solvent-tolerant lipases and/or immobilized, allowing its reuse and economic feasibility, that made it possible, biological catalysts and fluids pressurized once relegated to the background to become currently one of the most promising in the field of biodegradable polymers. In this context, polycaprolactone (PCL), a biodegradable polymer and bioresorbable, and the $scCO_2$, have permeated separately/together several areas of academic interest and industrial, with applications in the food, pharmaceutical, biomedical and ecological. From the combination of these technologies coupled with the possibility of large scale production (polymer) from continuous systems, emerges a vast territory of possibilities/opportunities for the academic and industrial sectors. In this context, this work aims to study the enzymatic polymerization of ring opening (e-ROP) of ϵ -caprolactone (ϵ -CL) in pressurized fluids by use of a continuous reactor packed (PBR) with immobilized enzymes (Novozym 435) aimed at defining the best conditions for the polymerization reaction. To this end, experiments were performed in carbon dioxide (CO_2) in order to assess the influence of the operating pressure (120 and 200 bar), the mass ratio solvent/monomer ($S/M = 2:1$ and $1:2$) and different space times (τ) of the substrate within the PBR on the income of Y reactions, number average molecular weight (M_n) and polydispersity index (PI). This study also evaluated the production of polycaprolactone for long time reactions with the same amount of enzymes, aiming to determine the retention of the enzymatic activity through constancy in the values of response variables of reactions of e-ROP (Y , M_n and IP). The best results obtained from these initial experiments were of 60,1 (wt%) and 53,5 (wt%) of monomeric conversion (Y) and of 21700 Da and 35800 Da of numeric molecular weight (M_n) to the experiments carried out with the ratio S/M of 2:1 and pressures of 120 and 200 bar respectively. But these values of Y and M_n decreased fast and expressively with the continuous processing of the reagents due to accumulation/adsorption of polymeric material on the enzymes. From these results it was decided to use one organic solvent (dichloromethane-DCM) as cosolvent for polymerization reactions with the best operating conditions previously obtained. In this sense, the use of DCM as a cosolvent in the reactions proved to be promises resulting

in high values of Y (93,3 wt%) and values of M_n around of 22500 Da for space times of only 15 minutes in reactions carried out at 120 bar and mass ratio S/MIX (MIX= 50 wt% of ϵ -CL + 50 wt% of DCM). Moreover, the Y values remained constant even after 6 τ (90 min.), while the M_n values remained constants less. From these results, several variables were tested aiming to improve the efficiency in the polycaprolactone production in continuous system, as: amount of water in the reaction medium, type and concentration of cosolvent in the medium, the use of ultrasonic waves in the e-ROP reactions and the use of n-butane as pressurized solvent. Some of the best operating conditions obtained from these experiments were used in e-ROP reactions carried out for up to 40 τ (10 h reaction time) using the same load of enzymes. This step resulted in values of Y 95,0 (wt%) and molecular weight (M_n) of 20000 (Da) these maximum values remained constant up to 10 hours of reaction with the same load of enzymes. From the results obtained it is concluded that both the equipment and the methodology developed in this work for the production of PCL in continuous mode proved extremely promising in the search for polymers with high added value.

Keywords: e-ROP, ϵ -caprolactone, Novozym 435, carbon dioxide, PBR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Aplicação de polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis. PAA: poli(anidrido de ácido); PBS: Poli(butileno succinato); PCA: Poli(cianoacrilato); PCL: Poli(ϵ -caprolactona); PDLLA: Poli(DL-lactídeo), Poli(ácido DL-láctico); PEA: Poli(amida de éster); PEC: Poli(carbonato de éster); PES: Poli(succinato de etileno); PGA: Poli(glicolídeo), Poli(ácido glicólico); PGALA: Poli(glicolídeo-co-lactídeo), Poli(ácido glicólico-co-ácido láctico); PHA: Poli(hidroxialcanoato); PHB: Poli(3-hidroxiбутirato); PLLA: Poli(L-lactídeo), Poli(L-ácido láctico); POE: Poli(ortoéster); CB: celulose bacteriana.	38
Figura 2.2 - Estrutura química da ϵ -caprolactona na sua forma cíclica (a) e unidade monomérica repetitiva da poli(ϵ -caprolactona) (b).	40
Figura 2.3 - Esquema básico da Engenharia de Tecidos.	43
Figura 2.4 - Mecanismo de transesterificação enzimática.	48
Figura 2.5 - Reações de transesterificação possíveis em um processo de polimerização de abertura de anel catalisada por lipase. Os números referem-se ao grupo carboxílico que é ativado pela enzima, as letras se referem ao grupo nucleofílico.	50
Figura 2.6 - Mecanismo de polimerização em etapas de lactonas cíclicas por abertura de anel tendo como iniciador a água.	51
Figura 2.7 - Diagrama de fases Pressão-Temperatura para um fluido puro, onde: P_c (pressão crítica), T_c (temperatura crítica) e C (ponto crítico).	55
Figura 2.8 - Diagrama de Densidade-Pressão do CO_2	56
Figura 2.9 - Micrografias eletrônicas de varredura de Novozym 435: (a) amplificação de 50 vezes, (b) amplificação de 200 vezes, (c) amplificação de 2000 vezes e (d) amplificação de 10.000 vezes. Observa-se da esquerda para a direita, as Micrografias eletrônicas referentes à enzima não tratada, tratadas em butano e em dióxido de carbono, respectivamente. Nos dois últimos casos as condições são: temperatura de $75^\circ C$, tempo de 6 horas, densidade reduzida de 1,6 e pressão de 276,4 bar.	60
Figura 2.10 - Comparação entre rendimentos (Y) das reações de e-ROP de ϵ -caprolactona para os reatores contínuo e batelada.	62
Figura 3.1 - Fluxograma da Sequência Metodológica Experimental adotada.	68
Figura 3.2 - Vista geral da Unidade Experimental.	72

Figura 3.3 – Aparato Experimental para polimerização de ϵ -caprolactona em modo Contínuo, legenda: SR – reservatório de solvente, TB1 – banho termostático, TB2 – banho ultrassônico, SP – bomba seringa, HPLP – bomba de alta pressão de líquidos, TI – indicador de temperatura, PBR – reator empacotado com enzimas, PT – transdutor de pressão, PI – indicador de pressão, MS – agitador mecânico, SB – recipiente com substrato, SF – fraco coletor de amostra, MSC – coluna de peneiras moleculares, MM – micro-misturador, CV – <i>check valve</i> , válvula de via única, MV – válvula agulha.	72
Figura 3.4 – Sistema de secagem do ar de entrada no PBR. Onde, (SB) reservatório de reagentes usados como substrato (MIX), (A) agitador magnético, (B) bomba usada para escoar os reagentes até o PBR, (C) entrada de ar no sistema e (D) mistura de peneiras moleculares de 4 Å e sílica gel.	78
Figura 4.1 - Resultados de rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 e 200 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2..	88
Figura 4.2 - Resultados cinéticos da massa molecular numérica média (M_n) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 e 200 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2.....	89
Figura 4.3 - Resultados cinéticos da massa molecular numérica média (M_n) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 e 200 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2.....	90
Figura 4.4 - Resultados de índice de polidispersão (IP) das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 e 200 bar para razões S/M de 2:1 e 1:2.....	92
Figura 4.5 - Cromatogramas de GPC para e-ROP de ϵ -CL a 200 bar, para razões S/M de 2:1 e tempos espaciais de 17,9 min. (A) e 1,5 min. (B).	92
Figura 4.6 - Comparação entre resultados de rendimento obtidos para PBR e Batelada realizados a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2, sendo: Bat. (Batelada) e [E] (enzima).	94
Figura 4.7 - Comparação entre resultados de M_n obtidos para PBR e Batelada realizados a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2, sendo: Bat. (Batelada) e [E] (enzima).	95
Figura 4.8 - Amostras de policaprolactona obtidas a 65°C, razão S/M de 2:1 e pressão de 200 bar para os seguintes tempos espaciais: A) 1,49 min., B) 1,79 min., C) 2,23 min., D) 2,98 min., E) 4,47 min., F) 8,93 min. e G) 17,86 min.	98

Figura 4.9 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.	100
Figura 4.10 - Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.	101
Figura 4.11 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.	102
Figura 4.12 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.	103
Figura 4.13 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 e 200 bar para razões S/M de 2:1 e 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima. Tempos espaciais (τ) foram de: (Δ) 10,7 min., (\bullet) 17,8 min., (+) 17,9 min. e (\square) 31,3 min.....	104
Figura 4.14 – Mn dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 120 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.	105
Figura 4.15 – Mn dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 120 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.	106
Figura 4.16 – Mn dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 200 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.	107
Figura 4.17 – Mn dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 200 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.	108
Figura 4.18 – Mn dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 200 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima. Tempos espaciais (τ) foram de: (+) 10,7 min., (\bullet) 17,8 min., (Δ) 17,9 min. e (\square) 31,3 min.....	109
Figura 4.19 – Valores de conversão monomérica (a) e Mn (b) como função do volume de reagentes processados pela mesma carga de enzimas.....	110
Figura 4.20 - Resultados de rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.....	117
Figura 4. 21 - Resultados de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.....	118

Figura 4.22 - Resultados de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.....	119
Figura 4.23 - Resultados de IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.....	120
Figura 4.24 – Rendimento para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.....	122
Figura 4.25 – Rendimento para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.....	123
Figura 4.26 – Valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.....	124
Figura 4.27 – Valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.....	125
Figura 4.28 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) no rendimento das reações Y de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	127
Figura 4.29 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) nos valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	128
Figura 4.30 - Efeito do conteúdo de água na enzima (%) para os valores de Y (%) e M_n nas polimerizações de ϵ -CL realizadas a 60 °C usando tolueno como solvente e a lipase Novozym 435 como catalisador. Onde, (A) efeito da água em Y e (C) efeito da água em M_n	130
Figura 4.31 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) no rendimento das reações (Y) de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	132
Figura 4.32 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) nos valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	133
Figura 4.33 - Efeito do tipo de solvente nos rendimentos de reação para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	135

Figura 4.34 - Efeito do tipo de solvente nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	136
Figura 4.35 - Efeito de ondas ultrassônicas nos rendimentos de reação (Y) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	139
Figura 4.36 - Efeito de ondas ultrassônicas nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	140
Figura 4.37 - Efeito de ondas ultrassônicas nos índices de polidispersão (IP) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	141
Figura 4.38 - Efeito da concentração de monômero nos rendimentos de reação (Y) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C e tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	142
Figura 4.39 - Efeito da concentração de monômero nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	143
Figura 4.40 - Comparação entre valores de rendimento de reação (Y) obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo para n-butano e scCO ₂ como solventes.	146
Figura 4.41 - Comparação entre valores de M_n obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo para n-butano e scCO ₂ como solventes.	147
Figura 4.42 - Comparação entre valores de M_n obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo para n-butano e scCO ₂ como solventes.	152
Figura 4.43 - Comparação entre valores de Y e M_n obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo neste trabalho contra dados experimentais reportados na literatura.	154
Figura 4.44 – Forma de análise por GPC das massas moleculares apresentadas por Kundu et al., (2011).	156
Figura A.1 – Aparato Experimental para polimerização de ϵ -caprolactona em modo Contínuo, legenda: SR – reservatório de solvente, TB1 – banho termostático, TB2 – banho ultrassônico, SP – bomba seringa, HPLP – bomba de alta pressão de líquidos, TI – indicador de temperatura, PBR – reator empacotado com enzimas, PT – transdutor de pressão, PI – indicador de pressão, MS – agitador mecânico, SB – recipiente com substrato, SF – fraco coletor de amostra,	

MSC – coluna de peneiras moleculares, MM – micromisturador, CV – <i>check valve</i> , válvula de via única, MV – válvula agulha.....	180
Figura A.2 – Reator de leito empacotado (PBR) com suas conexões de entrada de substrato (A) e saída de produtos (B). Onde, (C) é usada para auxiliar na limpeza do reator.	182

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 -Teores de água obtidos antes e/ou após a secagem dos reagentes e enzima.	71
Tabela 3.2 – Condições experimentais empregadas nos ensaios de e-ROP de ϵ -caprolactona realizadas em modo contínuo. Onde: (Cossol.) cossolvente, (S:M) razão solvente/monômero, (MIX) mistura de ϵ -CL + cossolvente, (S:MIX) razão solvente/MIX.....	82
Tabela 4.1 - Resultados de Y, M_n , M_w e IP para as reações de polimerização a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2 respectivamente.....	86
Tabela 4.2 - Resultados de Y, M_n , M_w e PI para as reações de polimerização a 200 bar, 65 °C e razão mássica S/M de 2:1 e 1:2 respectivamente.....	86
Tabela 4.3 - Resultados de Y, M_n , M_w e IP para as reações de polimerização a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2 respectivamente.....	115
Tabela 4.4 - Valores de Y, M_n e IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 200 bar e 65 °C para razão S/MIX ($scCO_2$ /mistura de reagentes) de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos para razões mássicas de ϵ -CL/DCM em MIX de 2:1.....	152
Tabela A.1 – Equipamentos e dispositivos de medida e auxiliares utilizados na montagem da unidade de polimerização a alta pressão em sistema contínuo, juntamente com suas faixas máximas de trabalho/segurança para, pressão (bar), temperatura (°C) e potência (Watts RMS), bem como seus respectivos fornecedores e/ou marcas.....	183
Tabela B.1 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.....	186
Tabela B.2 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.	187
Tabela B.3 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.	187
Tabela B.4 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.	188

Tabela B.5 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.....	188
Tabela B.6 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.....	189
Tabela B.7 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.....	189
Tabela B.8 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.....	190
Tabela C.1 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.....	192
Tabela C.2 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.....	192
Tabela C.3 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar, para razões S/MIX de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.....	193
Tabela C.4 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar, para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.....	193
Tabela C.5 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) sob o rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	194
Tabela C.6 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) sob os valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	195
Tabela C.7 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) no rendimento das reações (Y) de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	195
Tabela C.8 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) nos valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.....	196

Tabela C.9 - Efeito do tipo de cossolvente nos rendimentos de reação (%) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	197
Tabela C.10 - Efeito do tipo de cossolvente nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	197
Tabela C.11 - Efeito de ondas ultrassônicas nos valores de rendimentos de reação para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	198
Tabela C.12 - Efeito de ondas ultrassônicas nos valores de M_n e de IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	199
Tabela C.13 - Efeito da concentração de ϵ -CL nos valores de Y para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	200
Tabela C.14 - Efeito da concentração de ϵ -CL nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.	200
Tabela C.15 - Valores de Y, M_n e IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos usando n-butano como solvente.	201

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO ₂	Dióxido de carbono
CALB	Lipase da <i>Candida antarctica</i> – fração B
CPEA	Cadeia polimérica enzima ativada
DP ou GP	Grau de Polimerização
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
e-ROP	Polimerização enzimática por abertura de anel
ε-CL	ε-caprolactona
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GLP	Gás liquefeito de petróleo
GPC	<i>Gel permeation chromatography</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IP ou PI	Índice de polidispersão
MEA	Monômero-enzima ativado
M _i	Massa molecular média da faixa de tamanho i (Da)
M _n	Massa molecular numérica média (Da)
m _u	Massa molecular da unidade repetitiva (Da)
M _w	Massa molecular ponderal média (Da)
P	Pressão (bar)
PCL	Policaprolactona/Poli(ε-caprolactona)
Y	Rendimento (massa polímero/massa de monômero) (%)
scCO ₂	Dióxido de carbono supercrítico
PBR	Reator de leito empacotado
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i>
S/M	Razão solvente/monômero
T	Tempo de residência do substrato no reator
T _g	Temperatura de transição vítrea
THF	Tetraidrofurano
T _m	Temperatura de fusão
w _i	Fração em massa das moléculas na faixa de tamanho i
x _i	Fração em número das moléculas na faixa de tamanho i
MIX	Mistura de reagentes (monômero + cossolvente)
S/MIX	Razão mássica solvente/mistura de reagentes

ϵ_L	Porosidade do leito
V_e	Volume do reator empacotado com enzimas
V_R	Volume do reator sem enzimas
q_A	Vazão de alimentação de substrato
DCM	Diclorometano
τ	Tempo espacial (min.)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO.....	25
1.1 OBJETIVO GERAL.....	29
1.1.1 Objetivos Específicos.....	29
1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO	30
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	33
2.1 POLÍMEROS	33
2.1.1 Massa Molecular dos polímeros e sua Distribuição.....	35
2.1.2 Polímeros Biodegradáveis e/ou Biorreabsorvíveis/ Bioabsorvíveis.....	36
2.1.3 Policaprolactona.....	39
2.1.3.1 O uso de Scaffolds na Engenharia de Tecidos	42
2.1.3.2 Emprego comercial da policaprolactona nas áreas médica/farmacêutica/odontológica.....	44
2.2 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO.....	45
2.3 ENZIMAS	46
2.3.1 Polimerização por abertura de anel catalisada por enzima (e- ROP).....	47
2.3.2 O papel da água na e-ROP.....	51
2.4 SOLVENTES UTILIZADOS NA e-ROP.....	53
2.4.1 Fluidos pressurizados e/ou supercríticos como solventes.....	54
2.4.2 Uso de Fluidos pressurizados na e-ROP.....	57
2.5 REATOR CONTÍNUO VERSUS REATOR EM BATELADA PARA e-ROP DE ϵ -CL.....	61
2.6 USO DE ULTRASSOM EM E-ROP	63
2.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE	64
CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS.....	67
3.1 MATERIAL.....	69
3.1.1 Tratamento dos materiais.....	69
3.2 MÉTODOS.....	71
3.2.1 Aparato Experimental usado para a obtenção da poli(ϵ- caprolactona) em modo contínuo.....	71
3.2.1.1 Procedimento experimental	73
3.2.1.2 Tempo espacial.....	76
3.2.1.3 Preparação das misturas de reagentes (MIX)	77
3.2.2 Determinação das massas moleculares dos polímeros.....	79
3.2.3 Determinação da atividade enzimática.....	80
3.2.4 Condições experimentais empregadas nas e-ROPs de ϵ-CL realizadas em PBR.....	81

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	85
4.1 PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA SEM O USO DE COSSOLVENTE	85
4.1.1 Efeito das variáveis de processo nas reações de e-ROP.....	85
4.1.1.1 Morfologia dos polímeros obtidos	97
4.1.1.2 Produção de PCL em PBR para períodos prolongados.....	99
4.1.2 Considerações sobre as reações sem o uso de cossolvente.....	111
4.2 PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA COM O USO DE COSSOLVENTE	112
4.2.1 Efeito do uso de cossolvente nas reações de e-ROP realizadas com scCO₂.....	114
4.2.1.1 Produção de PCL com uso de cossolvente em PBR para períodos prolongados.....	120
4.2.1.2 Efeito do controle da quantidade de água no meio reacional sobre as reações de e-ROP	125
4.2.1.3 Efeito de diferentes cossolventes nas reações de e-ROP	133
4.2.1.4 - Efeito de ondas ultrassônicas nas reações de e-ROP com cossolvente.....	138
4.2.1.5 Efeito da concentração do monômero nas reações de e-ROP com cossolvente.....	142
4.2.2 Reações de e-ROP realizadas com n-butano na presença de cossolvente.....	144
4.2.3 Considerações sobre as reações de e-ROP com o uso de cossolvente.....	148
4.3 PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA PARA LONGOS PERÍODOS DE TEMPO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS.	150
CAPITULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES	157
5.1 CONCLUSÕES	157
5.2 SUGESTÕES	158
REFERÊNCIAS.....	161
APÊNDICE A – PROJETO E CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO USADO PARA PRODUÇÃO DE POLICAPROLACTONA EM MODO CONTÍNUO.....	179
APÊNDICE B – VALORES TABELADOS DE Y E Mn OBTIDOS DURANTE A PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA SEM O USO DE COSSOLVENTE.....	186
APÊNDICE C – VALORES TABELADOS DE Y, Mn E IP OBTIDOS DURANTE A PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA COM O USO DE COSSOLVENTE.....	191

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Nas últimas duas décadas, avanços significativos têm sido obtidos no desenvolvimento de polímeros biorreabsorvíveis e biodegradáveis usados para aplicações na medicina e em engenharia de tecidos biológicos em substituição aos materiais tradicionais como metais e cerâmicas, bem como nas áreas alimentícia e farmacêutica como ingrediente e/ou embalagem biodegradável, ou sistemas (veículos) de liberação de fármacos de forma controlada.

No entanto, processos de polimerização via rota química tradicional exigem a utilização de monômeros puros, de atmosfera inerte e de condições anidro. Além disso, utilizam compostos metálicos tóxicos como catalisadores, os quais devem ser completamente separados dos polímeros para o uso em aplicações biomédica (AL-AZEMI et al., 2002), alimentícia e farmacêutica.

Neste contexto, catalisadores biológicos não-tóxicos como enzimas imobilizadas, vêm ganhando espaço e “status” no meio acadêmico e industrial, como uma das alternativas mais promissoras para sanar tal problema. As enzimas têm se destacado por serem derivadas de fontes renováveis, atuando geralmente em condições brandas de temperatura, pressão e pH, além de não requererem a exclusão da água ou ar quando usadas como catalisadores na síntese de poliésteres (VARMA et al., 2005). Outra vantagem da utilização das enzimas para polimerização é que ao contrário da polimerização catalisada por metais, as enzimas tendem a ser enantiosseletivas, ou seja, há produção preferencial de um dos enantiômeros do polímero (AL-AZEMI et al., 2002). Além disso, as enzimas apresentam quimiosseletividade, ou seja, a reação ocorre seletivamente em um grupo químico levando à formação do produto correspondente (HEDFORS et al., 2005) e regioseletividade (SCHULZE; WUBBOLTS, 1999), onde a formação ou quebra de ligação é dada preferencialmente em uma única direção.

Albertsson e Srivastava (2008) apresentam uma extensa revisão sobre o emprego de enzimas pela comunidade acadêmica para a produção de polímeros biodegradáveis a partir de diversos monômeros. Dentre estes polímeros a poli(ϵ -caprolactona) tem se destacado como o polímero mais estudado pelo método de polimerização enzimática de abertura de anel (e-ROP).

Este fato vem ocorrendo porque a policaprolactona (PCL) apresenta facilidade de moldagem e fabricação. Além disso, apresenta

Capítulo 1: Introdução

propriedades mecânicas e cinéticas de degradação adequadas para conduzir o crescimento de tecidos vivos e para liberação controlada de fármacos contidos dentro de sua matriz. Ainda, a PCL permite que grupos funcionais sejam adicionados ao polímero para torná-lo mais adesivo, hidrofílico ou biocompatível, favorecendo as respostas celulares (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Soma-se a isso, o fato de as rotas de produção da PCL serem relativamente baratas em comparação com outros poliésteres alifáticos. Além disso, dispositivos de liberação de medicamentos fabricados com PCL já apresentam aprovação do FDA (Food and Drug Administration) e registo de marca (CE Mark) permitindo uma via de entrada mais rápida para o mercado (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Estes atributos favoráveis conferem à PCL a característica de ser a classe mais atrativa e útil de poliésteres biodegradáveis (PITT et al., 1980 apud HARRANE et al., 2006), principalmente quando empregada em dispositivos de liberação de medicamentos/vacinas de longa duração, e em materiais de sutura que degradam lentamente (NAIR; LAURENCIN, 2007; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Woodruff e Hutmacher (2010) apresentam uma excelente revisão sob o emprego da PCL em uma vasta variedade de estruturas para aplicações biomédicas e alimentícias como nanoesferas, nanofibras, espumas, malhas, membranas e *scaffolds*. Dentre estas, os *scaffolds* (estruturas tridimensionais desenhadas para abrigar o crescimento de células, permitindo a regeneração de tecidos) tem despertado grande interesse dos pesquisadores da área de *engenharia de tecidos* devido à sua ampla gama de aplicação na área biomédica.

A popularidade do uso dos polímeros biorreabsorvíveis na área biomédica deve-se ao fato de serem completamente absorvidos e eliminados do corpo humano através de produtos e subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molecular) sem efeitos colaterais residuais (VERT et al., 1992). A utilização destes polímeros na *engenharia de tecidos* como suportes (*scaffolds*) para crescimento de células e a formação de um novo tecido *in vivo* tem como vantagem (em relação aos materiais não biorreabsorvíveis) a redução do número de cirurgias, resultando em um menor tempo de recuperação para o paciente e ao mesmo tempo reduzindo o risco de infecção (REZWAN et al., 2006).

Dentre os produtos desenvolvidos e disponíveis comercialmente, que empregam a policaprolactona em sua composição, pode-se citar: o Osteoplug[®], um implante no formato de cogumelo utilizado para

preencher furos craniais (LOW et al., 2009), as fibras copoliméricas para sutura, chamadas de Monacryl[®] (MIDDLETON; TIPTON, 2000), os dispositivos Artelon[®] Spacer, criado para recuperar a funcionalidade articular e Artelon[®] Tissue Reinforcement/SportMesh[™] reforçador de tecidos, como, tendões com rupturas (rompidos) e tecidos moles como músculos e outros (ARTIMPLANT, 2013), o Neurolac[®], uma membrana guiadora de nervos usada para a reconstrução de nervos periféricos rompidos (WOODRUFF; HUTMACHER 2010), o SynBiosys[®], usado como veículo de liberação de drogas (NAIR; LAURENCIN, 2007) e o contraceptivo de longa duração Capronor[®] (NAIR; LAURENCIN, 2006), além do Resilon[®], um material termoplástico utilizado para preenchimento do canal da raiz do dente (JIA et al., 2005; JIA, 2005; JIA; ALPERT, 2003).

Dentre os diversos solventes usados na e-ROP de ϵ -caprolactona (LABET; THIELEMANS, 2009), pode-se citar o dióxido de carbono supercrítico como um solvente de uso recente e promissor, utilizado nos trabalhos de Rosso Comim et al. (2013), Thurecht et al. (2006), Nakaoki et al. (2005) e Loeker et al. (2004).

O dióxido de carbono supercrítico destaca-se em realação aos outros solventes por ser barato, não tóxico, não inflamável (KUMAR et al., 2004) e apresentar propriedades de transporte que podem acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000). Além disso, os fluidos supercríticos ou pressurizados podem ser facilmente separados do produto final por despressurização do sistema, podendo desta forma, ser reutilizado no processo.

Cabe ressaltar que, por não haver efetivamente nenhum remanescente de CO₂ residual no material após processamento, o CO₂ não é considerado exatamente um solvente, por isso não exige reavaliação pelo FDA dos EUA. Só a água também usufrui desta situação especial. Com efeito, a maior parte das operações comerciais empregando CO₂ como solvente foi iniciada para aproveitar tais vantagens particulares do CO₂ em produtos concebidos para o contato íntimo com o organismo humano, tais como: alimentos e dispositivos de uso biomédico e farmacêutico (BECKMAN, 2004).

Outros solventes pressurizados podem ser utilizados para a e-ROP de ϵ -CL como por exemplo, os hidrocarbonetos alifáticos ou suas misturas como o GLP (Gás Liquefeito de Petróleo).

Rosso Comim (2013) utilizou GLP como solvente pressurizado em reações de e-ROP de ϵ -CL e observou aumentos significativos no

Capítulo 1: Introdução

rendimento (Y) e massa molecular numérica média (Mn) dos polímeros obtidos, em relação ao uso de CO₂.

O GLP tem como componentes majoritários o propano e o n-butano, substâncias que apresentam baixos valores de constante dielétrica, similares ao do dióxido de carbono. O uso do GLP apresenta algumas vantagens como custo e pressões de trabalho inferiores em relação ao CO₂.

Nas duas últimas décadas, devido à rápida evolução da área de *engenharia de tecidos*, o potencial do mercado mundial para produtos poliméricos biorreabsorvíveis usados em aplicações biomédicas é estimado em cerca de 100 bilhões de euros por ano (BIOMATERIALS and TISSUE ENGINEERING, 2013). Isso sugere um enorme mercado para biomateriais poliméricos nas próximas décadas.

Neste “panorama” de biomateriais poliméricos, a escolha do tipo de reator para conduzir o processo de polimerização exerce forte influência na qualidade do polímero final obtido e na viabilidade econômica do processo (ZHANG; RAY, 2002). Os estudos relativos a e-ROP de ϵ -caprolactona em scCO₂ realizados até o presente momento foram realizados em batelada, em reatores/autoclaves de volume constante (SANTOS et al., 2012; TURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004) e mais recentemente em reator de volume variável (COMIM ROSSO et al., 2013). Porém, processos realizados em modo contínuo são geralmente mais vantajosos, incluindo baixo custo, ótimo controle do processo, alta produtividade e facilidade de operação (ZHANG et al., 2012).

Neste contexto, os únicos trabalhos relatados na literatura para e-ROP de ϵ -caprolactona em modo contínuo são os trabalhos de Zhang et al. (2012) e Kundu et al. (2011), ambos realizados em pressão atmosférica e usando tolueno como solvente nas reações. Nestes estudos, os maiores valores de Mn obtidos por Zhang et al. (2012) foram de 15,600 Da (Mn) para experimentos realizados com razões mássicas solvente/monômero (S:M) de 4:1 e temperaturas de 40 °C utilizando um reator contínuo empacotado (PBR), enquanto Kundu et al. (2011) atingiram valores de Mn próximos a 25000 Da (Mn) para experimentos realizados com razões S:M de 2:1 e temperaturas de 100 °C usando um microreator PBR. No entanto, as razões S:M usadas por Zhang et al. (2012) são muito altas podendo inviabilizar economicamente o processo de polimerização em modo contínuo. Já o trabalho realizado por Kundu et al. (2011), além do uso de altas temperaturas (100 °C) é realizado em

um microreator, o que confere uma maior complexidade para posteriores ampliações de escala, visando aplicações industriais.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma unidade experimental para polimerizações enzimáticas em modo contínuo de fácil operação e flexível a aumentos de escala e posterior estudo da e-ROP de ϵ -caprolactona em reator tubular contínuo empacotado (PBR), empregando-se fluidos pressurizados como solventes. Cabe destacar-se o ineditismo tanto do desenvolvimento de um equipamento para as reações de e-ROP em sistema contínuo em altas pressões quanto do método de polimerização em sistema contínuo em meio pressurizado com ou sem o uso de cossolventes.

1.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral, investigar a influencia das variáveis de processo na produção de poli(ϵ -caprolactona) em modo contínuo, utilizando uma lipase como catalisador enzimático em meio de fluidos pressurizados.

1.1.1 Objetivos Específicos

- a) Construção/montagem de um aparato experimental passível de adaptações e/ou ampliação de escala para produção de polímeros usando solventes pressurizados e em modo contínuo;
- b) Avaliar o efeito da pressão de operação e da razão mássica entre solvente e monômero no rendimento da reação (Y), massa molecular numérica média (M_n), massa molecular ponderal média (M_w) e índice de polidispersão (IP) do polímero obtido na polimerização de ϵ -caprolactona em modo contínuo e meio reacional pressurizado;
- c) Avaliar o efeito e a viabilidade do uso de diferentes cossolventes no meio reacional para produção de PCL em modo contínuo;
- d) Avaliar o efeito da quantidade de água presente no meio reacional em decorrência da umidade dos reagentes e da enzima (emprego de métodos de secagem do monômero e da enzima) nas variáveis M_n , M_w , IP e rendimento das reações.
- e) Avaliar o efeito de ondas ultrassônicas nas variáveis M_n , M_w , IP e rendimento da reação de polimerização visando definir a

Capítulo 1: Introdução

- viabilidade técnica do uso de tal tecnologia para e-ROP de ϵ -CL em sistema contínuo.
- f) Avaliar o efeito de diferentes concentrações de monômero no meio reacional quando no uso de cossolvente.
 - g) Testar a viabilidade do uso de n-butano em lugar do $scCO_2$ como solvente nas reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em PBR.
 - h) Realizar a produção de PCL em sistema contínuo para longos tempos de reação utilizando as melhores condições experimentais obtidas nas etapas anteriores.

1.2 ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma:

O capítulo 1 (observado anteriormente) apresenta a introdução e os objetivos geral e específicos da presente Tese de Doutorado.

O Capítulo 2 apresenta a Revisão Bibliográfica, que inicia com uma breve contextualização sobre os polímeros e algumas de suas propriedades. Em seguida são abordados os polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis, dando maior ênfase ao polímero poli(ϵ -caprolactona) no que tange suas propriedades/características e possibilidades de aplicação. Na sequência um enfoque especial é dado às reações de polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP) com uso de fluidos pressurizados. Algumas peculiaridades inerentes às reações de e-ROP realizadas em reatores de batelada e contínuo, bem como, sobre a utilização de ondas ultrassônicas em reações de e-ROP também são destacados neste capítulo. Uma sucinta explanação a respeito do estado da arte em reações de e-ROP, findam este capítulo.

No capítulo 3 são apresentados os materiais e métodos utilizados para as reações de polimerização e caracterização dos polímeros obtidos. Neste capítulo uma descrição detalhada da unidade experimental, bem como de seus equipamentos auxiliares de medida é apresentada.

O capítulo 4 apresenta os resultados e discussão a respeito dos dados experimentais obtidos nesta tese. Este capítulo é dividido em 4 seções ou grupos de dados experimentais visando uma melhor apresentação.

O capítulo 5 refere-se às conclusões estabelecidas no presente trabalho, assim como as sugestões para trabalhos futuros.

O apêndice A apresenta em detalhes a unidade experimental com seus equipamentos e dispositivos auxiliares de medida, bem como suas faixas de trabalho e fornecedores dos dispositivos/equipamentos.

O apêndice B apresenta os valores tabelados de Y e M_n obtidos durante a produção de PCL realizada sem o uso de cossolvente.

O apêndice C apresenta os valores tabelados de Y , M_n e IP obtidos durante a produção de PCL realizada com o uso de cossolvente.

CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os materiais poliméricos podem ser classificados quanto à sua origem em naturais, derivados de plantas e animais; e sintéticos, derivados na sua maioria, da indústria petroquímica. Sabe-se que desde o fim da Segunda Guerra Mundial, o campo dos materiais foi virtualmente revolucionado pelo advento dos polímeros sintéticos de forma que torna-se difícil imaginar o nosso cotidiano (seja na Indústria ou em nossos lares) sem o uso desses materiais.

Mais recentemente, a classe de polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis vêm ganhando espaço devido ao seu potencial uso nos setores médico e ecológico e dentre os polímeros pertencentes a esta classe, podemos destacar o polímero policaprolactona (objeto direto desta pesquisa) como um dos mais importantes e estudados a partir de 1980. A partir destes estudos observou-se que uma quantidade relativamente grande de características químicas e estruturais afetam as propriedades e o comportamento deste polímero. De forma que, uma revisão bibliográfica abrangendo todas estas características se tornaria bastante extensa e cansativa além de fugir do escopo deste trabalho.

Desta forma, o presente capítulo (capítulo 2) têm maior enfoque nas propriedades avaliadas e metodologias/ferramentas adotadas para a consecução dos objetivos propostos nesta tese de doutorado.

2.1 POLÍMEROS

Os polímeros são macromoléculas de elevada massa molecular, formadas pela repetição de unidades químicas chamadas *meros* ou unidades monoméricas. A reação de polimerização é responsável pela formação destes compostos por meio da combinação química (por valências principais) das moléculas menores (monômeros) para formar moléculas longas (polímeros), mais ou menos ramificadas com a mesma composição centesimal (AKCELRUD, 2007).

As cadeias poliméricas podem ser classificadas quanto à:

- Estrutura: linear (onde os *meros* são ligados entre si formando uma unidade contínua), ramificada (quando possui cadeias laterais), reticulada (contendo ligações cruzadas entre cadeias adjacentes), ou em rede (onde suas unidades estão conectadas de forma tridimensional formando redes);

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

- Tipo de composição monomérica: homopolímeros (formados por um único mero) e copolímeros (formados por mais de um tipo de mero);
- Forma de obtenção: polímeros de condensação e polímeros de adição;
- Mecanismo de reação: polimerização em etapas e polimerização em cadeia (AKCELRUD, 2007).

Quanto à morfologia no estado sólido os polímeros são classificados em amorfos e semicristalinos. Nos polímeros amorfos as moléculas são orientadas aleatoriamente e estão entrelaçadas formando o novelo polimérico. Os polímeros totalmente amorfos são geralmente transparentes. Nos polímeros semicristalinos as moléculas exibem um empacotamento regular, ordenado, em determinadas regiões. Este comportamento é mais comum em polímeros lineares, devido à sua estrutura regular. Devido às fortes interações intermoleculares, os polímeros semicristalinos são mais duros e resistentes; como as regiões cristalinas espalham a luz, estes polímeros são mais opacos (CALLISTER, 2002).

Em 1929, Carothers propôs uma classificação dos polímeros em duas categorias (AKCELRUD, 2007): polímeros de condensação (formados por reações com eliminação de pequenas moléculas como água, ácido clorídrico ou metanol) e polímeros de adição (formados sem que haja saída de moléculas, sendo a estrutura da unidade repetitiva idêntica àquela do monômero).

No entanto, de acordo com Stevens (1999), rotular um polímero como de adição ou de condensação pode ser inadequado, pois alguns polímeros podem ser sintetizados a partir de reagentes diferentes, e, conseqüentemente, pela classificação de Carothers, receberiam classificações diferentes dependendo da rota sintética utilizada. Neste contexto a classificação proposta por Flory (1953) baseada nos mecanismos de reação, se faz mais abrangente e divide os polímeros em duas classes: polimerização em etapas e polimerização em cadeia. A polimerização por etapas inclui todos os polímeros de condensação e aqueles formados por meio de etapas definidas. Enquanto, a polimerização em cadeia é composta pelas reações que requerem a formação de um centro ativo ao qual as moléculas de monômero adicionam-se para formar o polímero final (AKCELRUD, 2007).

2.1.1 Massa Molecular dos polímeros e sua Distribuição

Os materiais poliméricos se diferenciam dos demais materiais por possuírem longas cadeias, isto é, de alta massa molecular. As propriedades físico-químicas destes materiais são assintoticamente modificadas por mudanças na massa molecular, ou seja, quando comparados polímeros de alta e baixa massa molecular, maiores alterações nas propriedades destes materiais são observadas nas moléculas de menor massa. Cadeias são consideradas poliméricas quando sua massa molecular é superior a 10.000 Da, valores abaixo deste e não menores que 1.000 Da são chamados oligômeros e valores acima de 1.000.000 Da são considerados polímeros de massa molecular ultra-alta (CANEVAROLO, 2007).

O cálculo da massa molecular de um polímero não pode ser realizado da mesma maneira que é feito com compostos puros de baixa massa molecular devido ao fato de os polímeros serem formados por agrupamentos de moléculas de vários tamanhos, ou seja, exibem uma distribuição de massa molecular e por isso são denominados polidispersos (LUCAS et al., 2001). De acordo com Canevarolo (2007), a massa molecular média pode ser classificada em: massa molecular numérica média (M_n) e massa molecular ponderal média (M_w).

Lucas et al. (2001) e Canevarolo (2007) apresentam os conceitos clássicos de M_n e M_w , de acordo com as equações 2.1 e 2.2 respectivamente:

$$M_n = \frac{\sum N_i M_i}{\sum N_i} \quad (2.1)$$

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (2.2)$$

onde M_i representa a massa molecular média da faixa de tamanho i , e N_i representa o número total das cadeias poliméricas que se encontram dentro da faixa de tamanho correspondente.

De acordo com Canevarolo (2007), M_n é fortemente influenciada pelo número de cadeias, enquanto que para M_w , a massa das cadeias poliméricas presentes em cada fração é o fator mais importante.

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

Uma forma alternativa para expressar o tamanho médio da cadeia de um polímero é através do seu grau de polimerização (GP), que representa o número médio de unidades monoméricas em uma cadeia polimérica (CALLISTER, 2002).

A expressão a seguir relaciona a massa molar do polímero como um todo, M_n , com o grau de polimerização, GP , e a massa molar da unidade repetitiva, m_u .

$$M_n = GP \cdot m_u \quad (2.3)$$

A dispersão da massa molecular, ou índice de polidispersão (IP), é determinada pela razão entre a massa molecular ponderal média e a massa molecular numérica média (M_w/M_n). Para amostras “monodispersas”, ou seja, com índice de polidispersão (IP) muito próximo de um, os valores de M_n e M_w são praticamente idênticos (LUCAS et al., 2001). Entretanto, amostras de polímeros que contêm uma larga distribuição de massas moleculares, M_n e M_w significativamente diferentes, são denominadas “polidispersas” (STRELITZKI, 2000).

Cabe salientar que, apesar de a massa molecular e a massa molar terem o mesmo valor numérico para uma dada substância monodispersa, a unidade de medida de massa molecular é a unidade de massa atômica (u) ou dalton (Da) enquanto a massa molar é definida em gramas por mol (g/mol) (MILLS et al., 1993).

As massas moleculares médias (M_n e M_w) e o índice de polidispersão são ferramentas de extrema importância para a modificação de propriedades mecânicas, físicas e taxa de degradação/biodegradação dos polímeros (REZWAN et al., 2006).

2.1.2 Polímeros Biodegradáveis e/ou Biorreabsorvíveis/Bioabsorvíveis

A American Standard for Testing and Materials estabelece que polímeros *biodegradáveis* são aqueles nos quais a degradação resulta primariamente da ação de micro-organismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural (ASTM-D-883, 2011).

Já os materiais poliméricos *biorreabsorvíveis/bioabsorvíveis*, de acordo com Vert et al. (1992) podem ser definidos como:

Biorreabsorvíveis são materiais poliméricos e dispositivos sólidos que mostram degradação através da diminuição de tamanho e que são reabsorvidos *in vivo*; ex. materiais que são eliminados por rotas metabólicas do organismo. Biorreabsorção é um conceito que reflete a eliminação total do material e dos subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molar) sem efeitos colaterais residuais. O uso da palavra “biorreabsorção” é utilizado quando a eliminação é total.

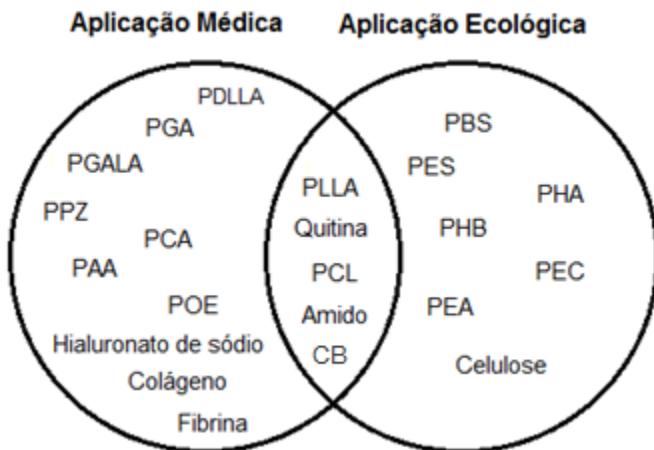
Bioabsorvível são materiais poliméricos e dispositivos que podem se dissolver em fluidos corpóreos sem qualquer clivagem da cadeia macromolecular ou diminuição de massa molecular. Por exemplo, este é o caso da lenta dissolução de implantes solúveis em fluidos orgânicos. Um polímero bioabsorvível pode ser biorreabsorvível se suas macromoléculas são excretadas (VERT et al., 1992).

Os polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis têm atualmente duas aplicações (entre outras) de extrema importância: uma é como polímeros biomédicos que contribuem na assistência médica dos pacientes e a outra, como polímeros ecológicos que mantêm o ambiente terrestre limpo. A maioria dos polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis disponíveis é utilizada para um ou outro dos dois propósitos, mas alguns deles são aplicáveis para ambos, como ilustrado na Figura 2.1 (IKADA; TSUJI, 2000).

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

Figura 2.1 - Aplicação de polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis. PAA: poli(anidrido de ácido); PBS: Poli(butileno succinato); PCA: Poli(cianoacrilato); PCL: Poli(ϵ -caprolactona); PDLLA: Poli(DL-lactídeo), Poli(ácido DL-láctico); PEA: Poli(amida de éster); PEC: Poli(carbonato de éster); PES: Poli(succinato de etileno); PGA: Poli(glicolídeo), Poli(ácido glicólico); PGALA: Poli(glicolídeo-co-lactídeo), Poli(ácido glicólico-co-ácido láctico); PHA: Poli(hidroxicanoato); PHB: Poli(3-hidroxibutirato); PLLA: Poli(L-lactídeo), Poli(L-ácido láctico); POE: Poli(ortoéster); CB: celulose bacteriana.

Fonte: Adaptado de Ikada; Tsuji, (2000).



Dentre os polímeros com possibilidade de uso para ambos os fins médico e ecológico, está a policaprolactona (PCL), foco do presente estudo e objeto de pesquisa há mais de 30 anos pelos setores acadêmico e industrial devido ao seu potencial uso como dispositivo para liberação de medicamentos. Mais recentemente a PCL tem encontrado participação como fonte principal ou aditiva para a produção de materiais biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis usados nas áreas médica, farmacêutica, odontológica, ecológica e alimentícia.

A biodegradação e a biorreabsorção de poliésteres como a PCL ocorrem inicialmente através da hidrólise das ligações ésteres resultando na diminuição do peso molecular do polímero, mas sem a perda de massa. Esta degradação inicial ocorre até peso molecular menor do que 50 kDa, no qual se dá início a degradação enzimática. A degradação final e reabsorção dos implantes prosseguem por meio de células do organismo como macrófagos, linfócitos e neutrófilos (PACHENCE,

2007), sendo caracterizada pela perda de massa, acompanhada pela redução do peso molecular, alteração estrutural, e perda das propriedades mecânicas como resistência à tração, à compressão e dureza (ATHANASIOU, 1998; BARBANTI, 2005).

Apesar de as PCLs serem biodegradadas por organismos vivos (bactérias e fungos), elas não são biodegradáveis em corpos de animais ou humanos por causa da falta de enzimas adequadas (VERT, 2009). Assim, o processo de biorreabsorção/absorção é mais lento (em relação à biodegradação), propagando-se via degradação hidrolítica.

A degradação da PCL tem sido estudada em diversos meios como água de rio, de lago e de mar, lodo de esgoto e solo, indicando que quanto maior a quantidade de microorganismos no meio, maior a taxa de degradação da PCL. Ainda, a degradação da PCL em ambientes aeróbicos é mais rápida do que em ambientes anaeróbicos (ALVES, 2008).

Diferentes fatores afetam a cinética de degradação de poliésteres, tais como: composição química e estrutura configuracional, histórico de processamento, massas moleculares (M_n e M_w), polidispersividade, condições ambientais, tensão mecânica, cristalinidade, tamanho do dispositivo, morfologia (por exemplo, a porosidade) e a orientação da cadeia, a distribuição de compostos quimicamente reativos dentro da matriz, os aditivos e hidrofiliicidade global (ANDREW et al., 2001; HEIDEMANN et al., 2001).

As propriedades que mais influenciam a degradação de polímeros são sua estrutura química e cristalinidade. Polímeros que possuem baixa cristalinidade, ou seja, a fase amorfa é maior na molécula, a taxa de degradação é maior devido à elevada mobilidade das cadeias. Em virtude disso, quanto mais cristalino o polímero, menor a taxa de degradação, já que as cadeias de polímeros com alta cristalinidade são mais resistentes (ALVES, 2008).

2.1.3 Policaprolactona

Poli(ϵ -caprolactona) – PCL é um polímero sintético semi-cristalino, de cadeia linear, pertencente à classe dos poliésteres alifáticos, com ponto de transição vítrea (T_g) de $-60\text{ }^\circ\text{C}$ e ponto de fusão variando entre $59\text{ }^\circ\text{C}$ e $64\text{ }^\circ\text{C}$ dependendo de sua natureza cristalina (SINHA et al., 2004). A explicação para existir uma faixa de temperaturas para fusão da policaprolactona (em vez de um ponto) vem do fato de na região cristalina do polímero existirem cristais de diferentes tamanhos e, portanto, a temperatura em que a fusão se inicia é

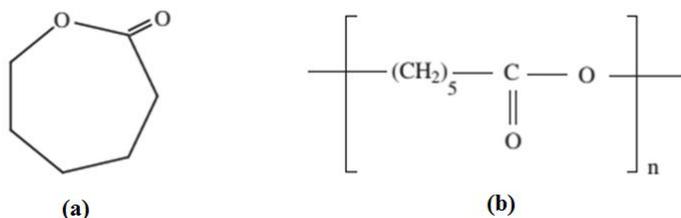
Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

diferente da temperatura em que ela é concluída (CANEVAROLO, 2001). De acordo com Aoyagia (2002), o início da degradação térmica da PCL se dá em torno de 230°C. Como sua temperatura de degradação térmica é muito superior à temperatura de fusão, não há problemas de degradação durante seu processamento (KOVALEVSKY et al., 2001).

A policaprolactona é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano em temperatura ambiente; possui baixa solubilidade em acetona, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico (COULEMBIER et al, 2006). Bordes et al., (2010) determinaram a solubilidade de PCL com diferentes massas moleculares em 99 solventes de grau analítico e definiram em quais solventes a PCL é solúvel, parcialmente solúvel ou insolúvel na condição de temperatura ambiente.

A policaprolactona (Figura 2.2b) é sintetizada pela polimerização por abertura de anel de ϵ -caprolactona (Figura 2.2a), um monômero relativamente barato, que pode ser obtido pela tradicional reação de oxidação Bayer-Villing a partir de ciclohexanona, por meio de catalisadores e altas temperaturas (HIKI, et al., 2000). Além disto, outras duas rotas alternativas foram desenvolvidas para a produção da ϵ -caprolactona. A primeira consiste na polimerização do ácido peroxicarboxílico (como 3-cloroperbenzóico ou ácido peracético) em acetona a 40°C, e a segunda chamada de “síntese verde” requer peróxido de hidrogênio como oxidante e zeólita impregnada com estanho como catalisador (COULEMBIER, et al., 2006).

Figura 2.2 - Estrutura química da ϵ -caprolactona na sua forma cíclica (a) e unidade monomérica repetitiva da poli(ϵ -caprolactona) (b).



A policaprolactona (PCL) foi um dos primeiros polímeros sintetizados pelo grupo Carothers em 1930 (VAN NATTA et al., 1934 apud WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Nas décadas de 1970 e

1980 juntamente ao grande desenvolvimento de polímeros considerados absorvíveis, a policaprolactona e seus copolímeros foram amplamente empregados em dispositivos para liberação de medicamentos. Esta atenção se deveu às inúmeras vantagens da PCL frente a outros polímeros em uso na época. A policaprolactona apresenta facilidade de moldagem e fabricação. Além disso, tem propriedades mecânicas e cinética de degradação adequadas para conduzir tecido em crescimento e também para possibilitar a liberação controlada de fármacos contidos dentro de sua matriz. A policaprolactona permite ainda que grupos funcionais sejam adicionados ao polímero para torná-lo mais adesivo, hidrofílico ou biocompatível, o que permite respostas celulares mais favoráveis (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

A partir do nascimento do campo da *engenharia de tecidos* a policaprolactona vem sendo amplamente estudada devido a suas propriedades como: material viscoelástico (ao deformar-se, sofre simultaneamente deformações elásticas e viscosas), cinética de degradação adequada, tamanhos de poros e propriedades mecânicas propícias para conduzir tecido em crescimento (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). A policaprolactona e seus copolímeros têm demonstrado ótimas propriedades como alta flexibilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de não toxicidade. Estes atributos favoráveis conferem à PCL a característica de ser a classe mais atrativa e útil de poliésteres biodegradáveis (PITT et al., 1980 apud HARRANE et al., 2006), principalmente quando empregada em dispositivos de liberação de medicamentos/vacinas de longa duração, e em materiais de sutura que degradam lentamente (NAIR; LAURENCIN, 2007; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Isso porque, a degradação da PCL tem um ritmo mais lento (2-3 anos) do que outros polímeros absorvíveis como polilactídeos e poliglicolídeos e possui alta permeabilidade a muitas drogas. Além disso, possuir rotas de produção relativamente baratas em comparação com outros poliésteres alifáticos. Outro fator importante, é que dispositivos de liberação de medicamentos fabricados com PCL já apresentam aprovação do FDA (Food and Drug Administration) e registro de marca (CE Mark) permitindo uma via de saída mais rápida para o mercado (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Woodruff e Hutmacher (2010) apresentam uma excelente revisão sob o emprego da poli(ϵ -caprolactona) em uma vasta variedade de estruturas para aplicações biomédicas e alimentícias como nanoesferas, nanofibras, espumas, malhas, membranas e *scaffolds*. Dentre estas estruturas, os *scaffolds* (estruturas tridimensionais desenhadas para

abrigar o crescimento de células, permitindo a regeneração de tecidos) tem despertado grande atenção dos pesquisadores devido à sua ampla gama de aplicação na área biomédica por tecnologias oriundas da *engenharia de tecidos*.

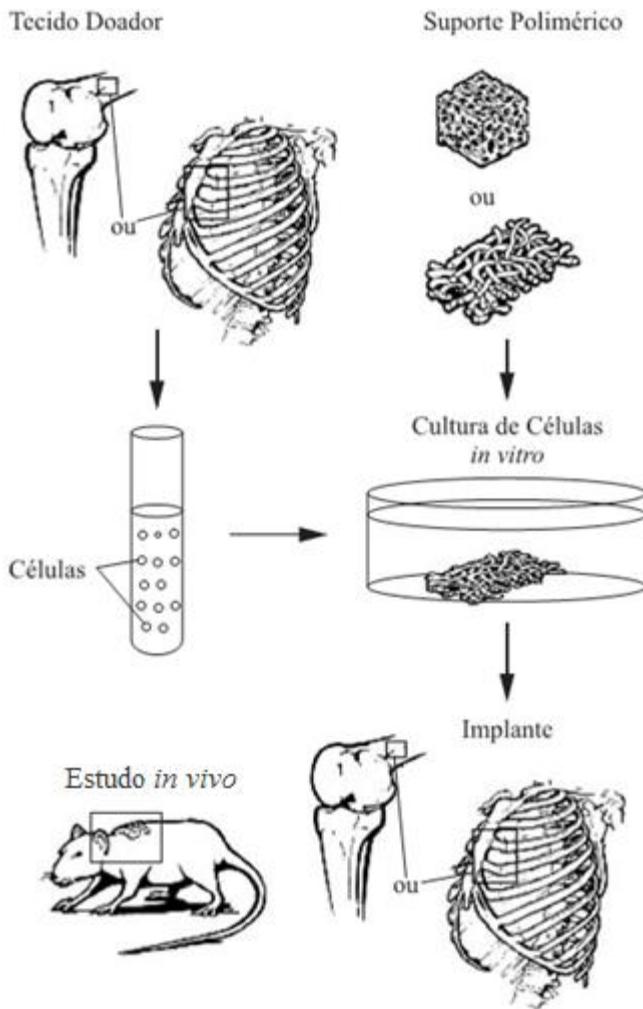
2.1.3.1 O uso de Scaffolds na Engenharia de Tecidos

A *Engenharia de Tecidos* consiste na regeneração de órgãos e tecidos vivos e pode ser aplicada de duas formas: na primeira (Figura 2.3) e mais importante, há a coleta de material celular de um indivíduo, que é dissociado em células específicas do tecido ou órgão em questão, em seguida as células são cultivadas sobre suportes biológicos ou sintéticos, conhecidos como *scaffolds* (suportes, matrizes tridimensionais, arcabouços, estruturas, etc.), para então serem reinseridos no paciente. Em outra linha, o *scaffold* é introduzido diretamente no paciente, sem uma cultura celular previamente implantada, necessitando desta forma, conter fatores de indução e proliferação para gerar atração e adesão celular para o tecido em questão ser reparado com eficiência (KAIGLER, 2001).

A função do *scaffold* é proporcionar tanto uma superfície para o crescimento celular quanto suporte mecânico e estrutural do tecido original enquanto o novo tecido é formado (BARBANTI et al., 2005). Na regeneração tecidual este suporte proverá o ambiente necessário para a diferenciação celular e definirá a forma final do tecido regenerado (HOKUGO et al., 2006). Estas estruturas provêm um suporte biomecânico inicial para o tecido implantado até que as células produzam a matriz extracelular adequada. Durante a formação, deposição e organização da nova matriz, o ideal é que o *scaffold* degrade e seja metabolizado, deixando que o órgão vital ou tecido seja reestabelecido, mantenha ou melhore sua função tecidual (STOCK; VACANTI, 2001).

Figura 2.3 - Esquema básico da Engenharia de Tecidos.

Fonte: Barbanti et al., 2005.



Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

2.1.3.2 Emprego comercial da policaprolactona nas áreas médica/farmacêutica/odontológica

Dentre os produtos desenvolvidos e disponíveis comercialmente nas áreas médica/farmacêutica/odontológica e que empregam a policaprolactona em sua composição, pode-se citar:

- Na área médica: o Osteoplug[®], um implante no formato de cogumelo utilizado para preencher furos craniais realizados para drenagem de hematomas subdurais crônicos (LOW et al., 2009) e as fibras copolímeras para sutura, formadas por poli(ϵ -caprolactona) com glicolídeo, chamadas de Monacryl[®] (MIDDLETON; TIPTON, 2000). O Artelon[®] Spacer, um dispositivo espaçador articular em forma de T, criado para reduzir a dor causada por osteoartrite e recuperar a funcionalidade articular (aproximadamente metade do dispositivo é compreendido por PCL) e Artelon[®] Tissue Reinforcement/SportMesh[™], um reforçador de tecidos compreendido por poliuretano à base de PCL, usado como reforço na reparação de tendões com rupturas (rasgado) e tecidos moles como músculos e outros (ARTIMPLANT, 2013). Woodruff e Hutmacher (2010) citam ainda o Mesofol[®], uma película transparente absorvível (formada a partir de lactídeo e PCL), que pode ser inserida entre os músculos, músculos e tendões e nervos para impedir a adesão pós-operatória, isto é, ajuda no deslizamento fisiológico livre destes tecidos, reduzindo assim a dor pós-operatória e prevenindo os efeitos negativos devido à congutinação (efeito de unir ou colar) tecidual, e o Neurolac[®], compreendido de PDDLA-co-PCL (65/35), uma membrana guiadora de nervos usada para a reconstrução de nervos periféricos rompidos que fornece orientação e proteção para axônios regenerados impedindo o crescimento de tecido fibroso na abertura do nervo durante sua regeneração.

- Na área farmacêutica: o SynBiosys[®], um copolímero multibloco bioabsorvível composto de ϵ -caprolactona, glicolídeo, lactídeo e polietilenoglicol usado como veículo de liberação de drogas (NAIR; LAURENCIN, 2007) e o contraceptivo de longa duração Capronor[®] que contém levonorgestrel (NAIR; LAURENCIN, 2006).

- Na área Odontológica: o Resilon[®], um material termoplástico com cerca de 25% a 40% de policaprolactona, usado para preenchimento do canal da raiz do dente (JIA et al., 2005; JIA, 2005; JIA; ALPERT, 2003).

2.2 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO

Os poliésteres alifáticos como, policaprolactona, polilactídeos e poliglicolídeos possuem duas rotas de produção distintas: (i) a polimerização por etapas ou policondensação, e (ii) a poliadição de abertura do anel (polimerização em cadeia). A técnica de polimerização por etapas promove a condensação de hidróxi-ácidos ou misturas de diácidos e dióis. As principais desvantagens deste mecanismo de polimerização são as altas temperaturas e os longos tempos de reação envolvidos que favorecem a formação de subprodutos devido às reações secundárias. Por outro lado, a polimerização por abertura de anel está livre de tais limitações, o que a torna preferível para síntese de PCL (JÉRÔME; LECOMTE, 2008). Por este mecanismo pode-se produzir poliésteres de alta massa molecular em condições brandas de operação do processo a partir de lactonas de diferentes tamanhos de anel (LOU et al., 2003).

A rota mais empregada para produção de policaprolactona e de seus copolímeros é a polimerização por abertura de anel (ROP) de ésteres cíclicos (lactonas, lactídeos e glicolídeos) mediante a utilização de uma variedade de catalisadores aniônicos, catiônicos e de coordenação (PENCZEK et al., 2007; LECOMTE et al., 2005). Para a síntese de PCL, vários compostos metálicos à base de estanho e zinco (CUI, 2004), alumínio (MIOLA et al., 1997), iodo (QUEIROZ, 2002) e outros metais (TORTOSA et al., 2001; YAMASHITA et al., 1996) têm sido utilizados como catalisadores. No entanto, os resíduos de catalisadores organometálicos não são tolerados em aplicações biomédicas, devido à sua toxicidade (LI et al., 2011). Esta é uma das maiores preocupações em aplicações biomédicas de polímeros biorreabsorvíveis devido a difícil remoção das impurezas metálicas, as quais podem tornar-se concentradas em remanescentes após a degradação da matriz polimérica (SCHWACH, 1996).

Neste contexto, catalisadores biológicos como as enzimas, considerados catalisadores não-tóxicos (THURECHT et al., 2006) e biocompatíveis (KOBAYASHI et al., 2001; VARMA et al., 2005), vêm ganhando espaço e “status”, no meio acadêmico e industrial, como uma das ferramentas mais promissoras para sanar tal problema. A *polimerização por abertura de anel catalisada por enzimas* (e-ROP) pode ser considerada como um processo sintético ecológico para materiais poliméricos, o qual evita a utilização de catalisadores organometálicos e promove um ótimo exemplo de “química verde de polímeros” (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008).

Cabe salientar que são várias as lactonas citadas na literatura para polimerização enzimática por abertura de anel ϵ -caprolactona (ϵ -CL), γ -caprolactona (γ -CL), δ -caprolactona (δ -CL), β -propiolactona (β -PL), β -butirolactona (β -BL), γ -butirolactona (γ -BL), δ -valerolactona (δ -VL), entre outras (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008). Dentre elas a ϵ -CL é a mais estudada, sendo catalisada por lipases de diversas origens uma vez que é facilmente disponível e que o polímero obtido é de fácil caracterização (SIVALINGAM; MADRAS, 2004). Além disso, condições brandas de reação (temperatura, pressão, pH e etc.), alta enantio e regioseletividade e reciclagem da enzima conferem grandes vantagens sobre a polimerização química convencional.

2.3 ENZIMAS

Biocatalisadores ou catalisadores biológicos (ex. enzimas) são proteínas cuja principal função é catalisar reações nos organismos. Os biocatalisadores são utilizados em química orgânica como uma alternativa aos processos químicos clássicos por apresentarem inúmeras vantagens. Dentre estas se destacam: a utilização de condições brandas; a compatibilidade com substratos sintéticos; em alguns casos podem catalisar as reações nos dois sentidos e podem, ainda, apresentar seletividade quanto ao tipo de reação que catalisam (PAQUES; MACEDO, 2006).

A catálise *in vitro* é caracterizada pelo uso de enzimas isoladas de organismos vivos, como bactérias, e aplicadas em água ou até mesmo em meios orgânicos para promover reações específicas (GEUS, 2007).

Na natureza, as enzimas podem ser divididas em seis classes: oxido-redutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e ligases. As hidrolases são as enzimas mais investigadas na síntese *in vitro*, pois incluem as lipases nesta categoria, que são usadas para a hidrólise de ésteres graxos na natureza. As lipases são enzimas ativas na interface água-gordura nas células, portanto tem a característica de catalisar reações em meio orgânico. Elas atuam tanto em reações de hidrólise como de condensação. Podem ser usadas para reações de policondensação e politransesterificação, polimerizações de abertura do anel e reações de modificação do polímero sem o uso de co-catalisador (GEUS, 2007).

O alto custo das enzimas foi considerado durante muito tempo como empecilho à sua utilização em processos comerciais. Entretanto, avanços tecnológicos que incluem o estudo da utilização de lipases solvente tolerantes e de lipases imobilizadas, permitindo a reutilização

do catalisador, tornaram possível o desenvolvimento de sistemas de baixo custo (FUKUDA et al., 2001).

2.3.1 Polimerização por abertura de anel catalisada por enzima (e-ROP)

A polimerização mediada por enzimas tem emergido como um método novo e importante da preparação de polímeros. Enquanto catalisadores tradicionais, muitas vezes contêm espécies metálicas tóxicas e prejudiciais ao meio ambiente, a catálise enzimática é vista como uma alternativa ecologicamente amigável (THURECHT et al., 2006).

A primeira e-ROP de lactonas foi apresentada em 1993 quando Knani et al. (1993) e Uyama e Kobayashi (1993) publicaram independentemente trabalhos sobre a abertura do anel para polimerização de ϵ -CL catalisada por lipase. Desde então, várias lipases foram estudadas na e-ROP, transesterificação e policondensação. Uma extensa revisão destas lipases investigadas para polimerizações enzimáticas foi publicada por Kobayashi et al. (2001) e Gross et al. (2001) e atualizada por Varma et al. (2005).

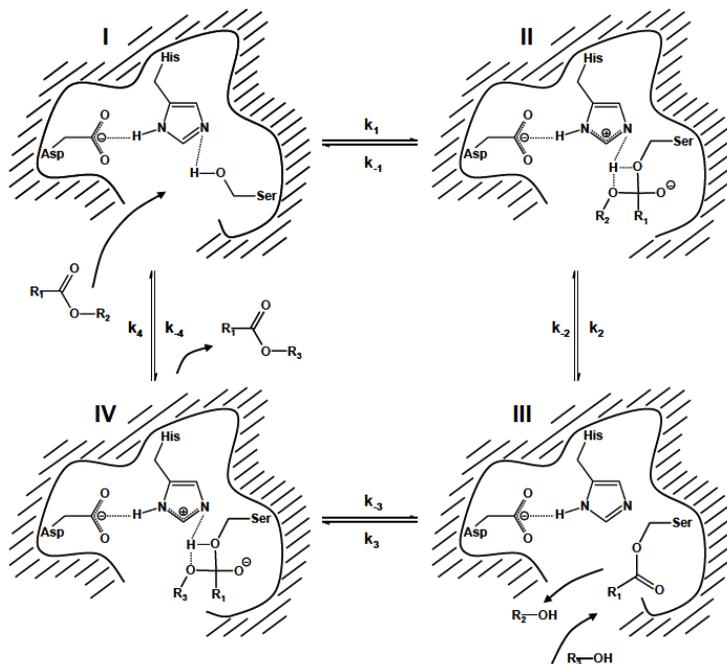
Na e-ROP de ϵ -caprolactona são reportados o uso de lipase de *Candida antarctica*, de *Candida cylindracea*, de *Candida rugosa*, de *Pseudomonas fluorescens*, de *Pseudomonas cepacia* e de lipase de pâncreas suíno, entre outras. Cabe salientar-se que, dentre estas enzimas, a mais aplicada na e-ROP de ϵ -Caprolactona (THURECHT et al., 2006; ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008) tem sido a lipase *Candida antarctica B* (CALB), uma lipase comercialmente disponível (Novozym-435) imobilizada em uma resina polimérica macroporosa de metacrilato de metila (Lewatit VP OC 1600, Bayer) (CHEN et al., 2007). A CALB é constituída por 317 aminoácidos e tem uma massa molecular de 33 kDa. Esta lipase pertence à família das alfa/beta hidrolases, e foi inicialmente obtida a partir da levedura *C. antarctica*. A estrutura de DNA e sequência de aminoácidos da CALB foi resolvida em 1994 e uma tríade catalítica de serina-histidina-aspartato (presente no sítio ativo da enzima) é responsável pela sua atividade catalítica (UPPENBERG et al., 1994).

Segundo Geus (2007), a Novozym 435 é um catalisador altamente versátil, com imobilização termoestável e com atividade sobre uma grande variedade de substratos em vários solventes orgânicos e que (THURECHT et al., 2006) tem demonstrado ser extremamente eficaz para catalisar a polimerização de abertura de anel de ϵ -caprolactona.

O mecanismo da polimerização enzimática por abertura de anel (e-ROP) foi proposto em detalhes por Geus (2007) a partir dos trabalhos de Henderson et al. (1996) e Uyama et al. (1995), o qual é derivado do mecanismo de transesterificação enzimática (Figura 2.4).

Figura 2.4 - Mecanismo de transesterificação enzimática.

Fonte: Geus (2007).



O sítio ativo da lipase (Figura 2.4), catalisador das reações de transesterificação e polimerização, é formado por serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp), uma tríade catalítica estabilizada eletronicamente. No mecanismo de e-ROP, um éster cíclico (ex. presente na ϵ -caprolactona) sofre um ataque nucleofílico do grupo álcool primário da serina no sítio ativo da enzima (I), levando a formação de uma espécie intermediária (II). Na transesterificação, o grupo alcóxi original (R_2-OH) então é liberado (III), formando um (MEA) complexo monômero-enzima ativado (III). Entretanto, no caso de uma reação de polimerização por abertura do anel (e-ROP), o grupo alcóxi não será

liberado uma vez que a ϵ -caprolactona é cíclica. O nucleófilo, que na Figura 2.4 é representado por um álcool primário (R3-OH), ataca esta espécie MEA (III) formando uma espécie intermediária (IV). Então, o produto final, um polímero de cadeia curta (oligômero de ϵ -caprolactona), é liberado e a enzima é regenerada.

Na polimerização por abertura do anel, o nucleófilo R3-OH, que é necessário para regenerar a enzima e criar o oligômero/polímero, pode ser considerado como o *iniciador da polimerização*. Este iniciador pode ser água (THURECHT et al., 2006; MEI et al., 2003), iniciadores bifuncionais (GEUS et al., 2005), álcoois e aminas (UYAMA et al., 1998; HENDERSON et al., 1996), bem como carboidratos (BISHT et al., 1998). O produto com anel aberto (oligômero), formado após um ciclo catalítico tem em sua estrutura uma molécula-hidroxila de um lado e o iniciador-funcional no outro. Desta forma é possível identificar o iniciador que deu origem à molécula (GEUS et al., 2005). No entanto, uma vez que a enzima necessita de água para manter sua estrutura, a utilização de outros nucleófilos resulta em produtos onde frações das cadeias produzidas foram iniciadas por água resultando em uma mistura de cadeias com diferentes grupos terminais (HENDERSON et al., 1996).

A etapa de propagação da reação ocorre por um ataque nucleofílico da molécula-hidroxila presente na cadeia do oligômero (formado no ciclo anterior) aos complexos MEA (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008) gerando complexos cadeia polimérica enzima ativada (CPEA), que resultará na formação de uma cadeia polimérica com mais uma unidade monomérica (como produto final de mais um ciclo) e assim sucessivamente.

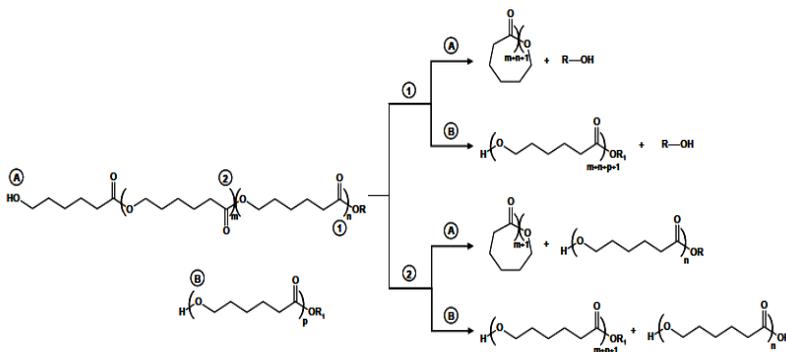
Cabe salientar que, durante a etapa de propagação via e-ROP, diferentes produtos finais podem ser obtidos. Dentre estes, a formação de polímero cíclico por transesterificação intramolecular tem sido reportada na literatura (THURECHT et al., 2006; MATSUMURA et al., 2000; CORDOVA et al., 1998). Isso ocorre devido à enzima ter a função de ativar ligações éster, podendo dessa forma, escolher ativar o grupo éster dos monômeros ou dos polímeros presentes no meio reacional, dependendo da afinidade da enzima com um ou com outro (KUMAR; GROSS, 2000). Portanto, dependendo do local exato da ativação no polímero (no final da cadeia polimérica ou ao longo desta) e do tipo de nucleófilo que reage com as espécies CPEA, diferentes espécies de polímeros (Figura 2.5) podem ser obtidos por transesterificação (GEUS et al., 2005).

Observa-se na Figura (2.5), que, se um grupo carboxílico final de uma cadeia polimérica é ativado (1), e nucleofilicamente atacado pelo

grupo hidroxila final da mesma cadeia (A), água ou iniciador será liberado e uma cadeia polimérica cíclica será formada (1A). Este tipo de transesterificação intramolecular é chamada de condensação end-to-end. Quando o grupo carboxílico final de uma cadeia polimérica é ativado (1) e atacado pelo grupo hidroxila final de uma outra cadeia polimérica (B), novamente iniciador ou água é formado, mas agora uma cadeia polimérica linear será formada, que pode ser considerada como uma cadeia extensa (1B). Se uma carbonila na cadeia de polímero é ativada (2), reações semelhantes acontecem. Quando esta cadeia polimérica enzima-ativada é atacada pelo grupo hidroxila final do mesmo polímero (A), será formada uma cadeia cíclica e uma cadeia polimérica linear com menor massa molecular (2A). Quando a carbonila ativada é atacada por um grupo hidroxila final de outra cadeia polimérica (B), duas cadeias serão criadas, geralmente uma menor do que as cadeias originais, e outra mais longa (2B) (GEUS, 2007).

Figura 2.5 - Reações de transesterificação possíveis em um processo de polimerização de abertura de anel catalisada por lipase. Os números referem-se ao grupo carboxílico que é ativado pela enzima, as letras se referem ao grupo nucleofílico.

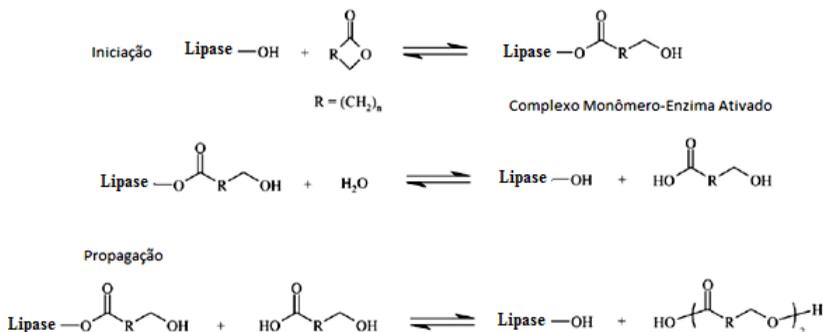
Fonte: Geus (2007).



Albertsson e Srivastava (2008) apresentam ainda, a e-ROP de lactonas cíclicas (Figura 2.6) de uma forma simples, devido a contemplar apenas polímeros lineares como produto final, porém complementar ao proposto por Geus (2007), no que tange a utilização de água (usada no presente estudo) como nucleófilo iniciador.

Figura 2.6 - Mecanismo de polimerização em etapas de lactonas cíclicas por abertura de anel tendo como iniciador a água.

Fonte: Albertsson e Srivastava (2008).



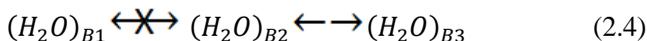
Na Figura 2.6, observa-se inicialmente a abertura do anel do monômero formando o complexo MEA. Em seguida o complexo MEA sofre um ataque nucleofílico da água (iniciador) presente dentro da enzima, liberando a lipase e originando um polímero de cadeia curta, o ácido ω-hidróxi-carboxílico (produto de um ciclo catalítico usando a água como iniciador). Durante a etapa de propagação o ataque nucleófilo pelo grupo hidroxilo terminal do ácido ω-hidróxi-carboxílico em EAM leva à formação de uma cadeia polimérica alongada por mais uma unidade monomérica e assim sucessivamente (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008).

2.3.2 O papel da água na e-ROP

Na e-ROP a água além de atuar como iniciador da reação desempenha um papel importante na conformação e flexibilidade das enzimas, o que permite uma maior estabilidade das mesmas (SIVALINGAM et al., 2003; ADLERCREUTZ, 1991; ZAKS; KLIBANOV, 1988). As enzimas necessitam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo quando estão ligadas covalentemente a um suporte. A água contribui ainda para a integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, e pode também limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (DALLA VECCHIA et al., 2004).

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

De acordo com Lee et al. (1998) as enzimas contêm água em três níveis diferentes (equação 2.4): O primeiro nível de hidratação é dado por água fortemente ligada (B1), ou seja, água não disponível para troca, mas para estabilizar a conformação ativa da enzima por hidratação de todos os grupos polares e iônicos. O segundo nível representa a água ligada fracamente à enzima (B2). Supõe-se que as moléculas de água que fazem parte do segundo nível promovem a cobertura completa dos sítios de ligação de hidrogênio e formam uma monocamada em todas as superfícies não-polares. Como as moléculas de água presentes neste nível se ligam apenas fracamente à enzima, essa água pode ser trocada com a água do terceiro nível (B3), a água "livre", ou seja, água sem uma função específica dentro da enzima e que é facilmente disponível. A equação (2.4) apresenta de uma forma esquematicamente simples a existência destas três camadas de água com suas possíveis direções de troca (de moléculas de água) onde a troca entre as camadas B2 e B3 ocorrem livremente enquanto para as camadas B1 e B2 não.



Ainda, o controle sobre a quantidade de água no meio reacional tem papel crucial no tamanho das cadeias poliméricas obtidas pela e-ROP (MEI et al., 2002), pois o conteúdo de água (se em quantidades inadequadas) pode afetar a polimerização e causar a degradação da policaprolactona (SIVALINGAM et al., 2003). Thurecht et al. (2006) e Mei et al. (2003) estudaram o efeito de diferentes quantidades de água como iniciador da e-ROP de policaprolactona, usando a enzima Candida antarctica B (CALB) e observaram uma relação inversa entre o conteúdo de iniciador e a massa molecular dos polímeros, ou seja, em maiores concentrações de água (água livre), menores massas moleculares dos polímeros foram obtidas devido à hidrólise das ligações éster alifáticas das cadeias de policaprolactona.

Diversas pesquisas tem demonstrado a influência de parâmetros fundamentais na e-ROP de caprolactona além da quantidade de água livre, como a temperatura do sistema e o tipo de solvente empregado na reação de polimerização (THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; MEI et al., 2003; MEI et al., 2002; KUMAR; GROSS, 2000). Nestes trabalhos observou-se que, em temperaturas em torno de 65 °C (temperatura ótima de atividade da enzima), menores quantidades de água livre e o uso de fluidos pressurizados, como dióxido de carbono

(CO₂), como solvente tem resultado em maiores conversões do monômero, maiores massas moleculares e menores polidispersões do produto final.

2.4 SOLVENTES UTILIZADOS NA e-ROP

A partir da primeira e-ROP de lactonas apresentada em 1993, um esforço considerável tem sido direcionado para melhorar a cinética de polimerização de abertura do anel de lactonas catalisada por enzimas visando sua aplicação industrial. Neste contexto a otimização do meio reacional, através da manipulação de diferentes tipos e concentrações de solventes merece destaque. Labet e Thielemans, (2009) apresentam uma ampla revisão de solventes (orgânicos ou não) possíveis para serem utilizados em e-ROP de ϵ -caprolactona.

No entanto, preocupações ambientais decorrentes de solventes voláteis (JÉRÔME; LECOMTE, 2008) e/ou fisiológicas decorrentes de potenciais resíduos de solventes orgânicos em dispositivos para liberação de fármacos ou para implantes biomédicos tem despertado grande interesse da comunidade científica nos últimos anos em relação ao uso de fluidos supercríticos (como o CO₂) como solventes.

Outro solvente de possível aplicação na produção de polímeros biodegradáveis livres de contaminantes tóxicos é o diclorometano (DCM). Devido a sua elevada pressão de vapor (350 mm Hg a 20°C) e temperatura de ebulição (40 °C a pressão atmosférica) bem abaixo da temperatura de fusão dos polímeros biodegradáveis (PUBLIC HEALTH GOALS FOR CHEMICALS IN DRINKING WATER, 2000), este solvente vem sendo usado com grande êxito na produção de *scaffolds* poliméricos pela comunidade científica (ELOMAA et al., 2011; XIE et al., 2009; CHEW et al., 2008; SANGSANOH et al., 2007; YANG et al., 2005; KWON et al., 2005). Cabe ressaltar que, em todos estes estudos, os *scaffolds* passaram por testes de cultivo e crescimento de diferentes tipos de células (ex. células tronco mesenquimais) com sucesso. Isso porque o DCM pode ser fácil e completamente separado dos polímeros ou *scaffolds* após seu processamento, por uso de vácuo a temperaturas ambientes, ou pressão atmosférica e temperaturas abaixo da de fusão polimérica. Destaca-se ainda que, durante a produção de polímeros, um correto sistema de coleta e armazenamento do DCM resulta na possibilidade de reuso deste no sistema.

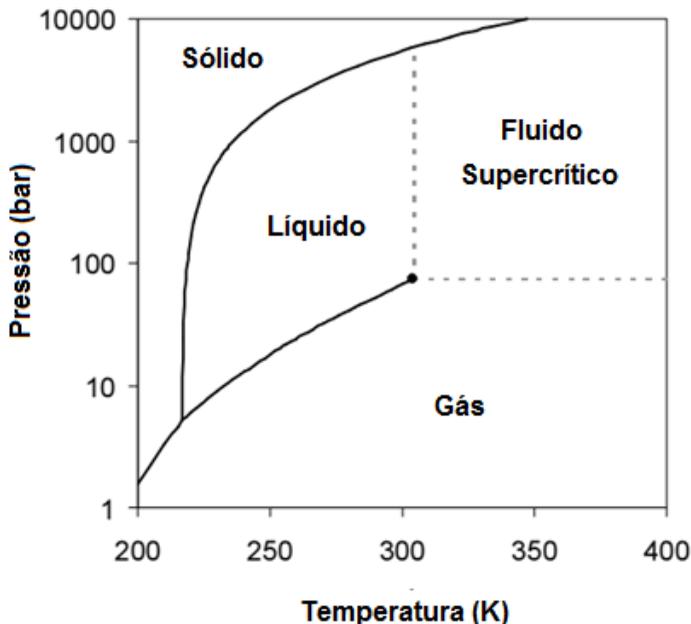
2.4.1 Fluidos pressurizados e/ou supercríticos como solventes

Um fluido supercrítico (Figura 2.7) pode ser definido como uma substância que se encontra em condições de temperatura e pressão acima dos seus valores críticos (acima do ponto crítico) passando a ter propriedades intermediárias entre um gás e um líquido (BRUNNER, 2004). A combinação das propriedades das fases líquida e vapor pode ser extremamente vantajosa para a utilização dos fluidos supercríticos (FSC) como solventes. Nas vizinhanças do ponto crítico o FSC possui densidade próxima à do líquido (o que fortalece as suas propriedades de solvente). Por outro lado, a viscosidade, a difusividade e a tensão superficial apresentam valores próximos às do estado gasoso, o que torna as propriedades de transporte desses fluidos bastante favoráveis ao processo. Todas estas propriedades singulares fazem dos FSC um meio bastante interessante para reações químicas. Tais propriedades de transporte, semelhantes a dos gases, facilitam as taxas de transferência de massa entre reagentes e catalisadores. Em reações limitadas pela difusão, a cinética, em geral, será mais favorecida em fluidos supercríticos do que em solventes líquidos convencionais (MESIANO et al., 1999).

Dentre os FSC disponíveis, o dióxido de carbono supercrítico (scCO₂) é um dos mais empregados devido à sua baixa toxicidade, baixo custo, não inflamabilidade e parâmetros críticos de fácil acesso (T_c = 31,4 °C, P_c = 73,8 bar). Além disso, o CO₂ é amplamente disponível em alta pureza a partir de fontes comerciais e industriais e também pode ser reutilizado (JÉRÔME; LECOMTE, 2008). Em comparação aos solventes orgânicos usuais, o dióxido de carbono supercrítico não é tóxico, não é inflamável e apresenta risco ambiental consideravelmente menor. Sua utilização em processos industriais apresenta como vantagem a ausência de traços de solvente no produto final, a possibilidade de reciclagem do efluente gasoso, a facilidade de separação do solvente da amostra e propriedades favoráveis de transporte que podem acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (ANDRADE, 2008).

Figura 2.7 - Diagrama de fases Pressão-Temperatura para um fluido puro, onde: P_c (pressão crítica), T_c (temperatura crítica) e C (ponto crítico).

Fonte: Jacobs (2005).



De acordo com McHugh e Krukoniš (1994), o poder solvente dos fluidos supercríticos está relacionado principalmente à sua densidade. Neste contexto, o CO_2 por ser altamente compressível nas vizinhanças do seu ponto crítico (Figura 2.8), pode ter sua densidade facilmente modificada, e por consequência, alterar os parâmetros de solubilidade e de constante dielétrica manipulando-se as condições de pressão e de temperatura (HABULIN; KNEZ, 2001). Além disso, a possibilidade de alterar o estado físico do CO_2 , de fluido supercrítico para gás, por simples depressurização do sistema é bastante interessante para separação de produtos reacionais além de possibilitar a ausência de solvente no produto final da reação (THURECHT et al., 2006) e permitir sua reutilização em processos industriais (BECKMAN, 2004).

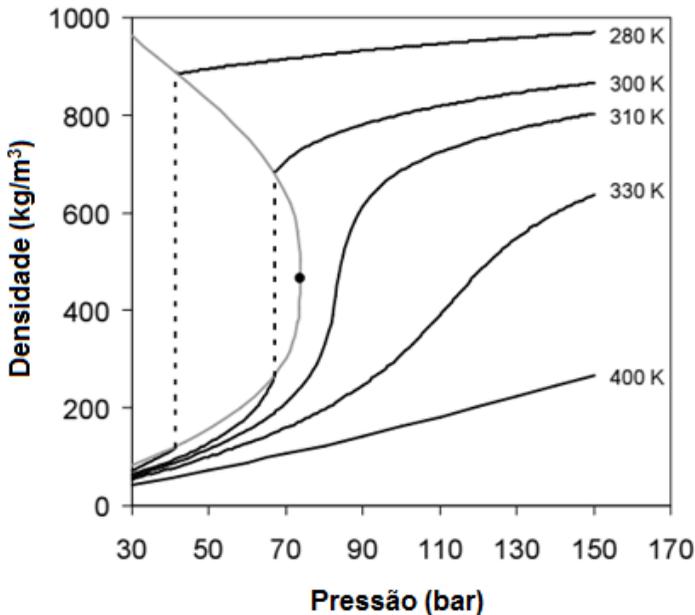
Cabe ressaltar que, por não haver efetivamente nenhum remanescente de CO_2 residual no material após processamento, o CO_2 não é considerado exatamente um solvente, por isso não exige reavaliação pelo FDA dos EUA. Só a água também usufrui desta situação especial. Com efeito, a maior parte das operações comerciais

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

empregando CO₂ como solvente foi iniciada para aproveitar tais vantagens particulares do CO₂ em produtos concebidos para o contato íntimo com o organismo humano, tais como: alimentos e dispositivos de uso biomédico e farmacêutico (BECKMAN, 2004).

Figura 2.8 - Diagrama de Densidade-Pressão do CO₂.

Fonte: Jacobs (2005).



Beckman (2004) apresenta uma ampla revisão referente à utilização de CO₂ nos mais diferentes processos, revelando uma permeação deste fluido por diversas áreas industriais como farmacêutica, alimentícia, nutracêutica, polimérica, catalítica, e entre outras. O autor enfatiza que a utilização cuidadosa da tecnologia com tal fluido pode resultar em produtos e processos “limpos”, mais baratos e de alta qualidade.

Durante algum tempo, a baixa solubilidade de muitos polímeros, incluindo poliésteres alifáticos, em scCO₂ foi encarada como uma desvantagem. No entanto devido ao fenômeno de plasticização (efeito de redução da temperatura de transição do polímero) esse conceito tem

se modificado (TAI et al., 2007). Muitos autores tem demonstrado que na presença de CO₂, a temperatura de transição vítrea e a temperatura de fusão da caprolactona são alteradas (são diminuídas). Isso ocorre devido à sorção do CO₂ no polímero que em geral aumenta com o aumento da pressão (FANOVICH; JAEGER, 2012; TAI et al., 2007; LIAN et al., 2006). A plasticização, por causar a redução da viscosidade da policaprolactona, auxilia na polimerização uma vez que facilita a difusão do iniciador e do monômero para a fase polimérica.

Por estas razões, nos últimos anos o CO₂ supercrítico tem sido muito estudado para a e-ROP de lactonas e lactídeos e seu processamento (JÉRÔME; LECOMTE, 2008).

Além do CO₂, vários outros fluidos pressurizados podem ser utilizados como solventes para a e-ROP de lactonas. Dentre eles podemos citar o propano, n-butano e GLP (Gás Liquefeito de Petróleo). No entanto, exceto pelo trabalho realizado por Rosso Comim (2013) na e-ROP de ϵ -caprolactona usando GLP como solvente, estes ainda se fazem inexplorados.

2.4.2 Uso de Fluidos pressurizados na e-ROP

O uso de fluidos pressurizados na e-ROP de ϵ -caprolactona é relativamente recente, com trabalhos realizados por Comim Rosso et al. (2013); Santos et al. (2012); Thurecht et al. (2006) e Loeker et al. (2004). Todos os autores utilizaram scCO₂ como solvente na e-ROP de ϵ -caprolactona catalisada pela lipase *Candida antarctica* fração B (CALB). Nestes estudos, Comim Rosso et al. (2013) obtiveram um polímero (policaprolactona) com massa molecular numérica média (M_n) de até 13,7 kDa e índices de polidispersão (IP) de 1,2 a 1,7, enquanto Santos et al., (2012) obtiveram uma policaprolactona com M_n de 7,4 kDa e IP de 1,96. Thurecht et al., (2006) produziram policaprolactona com M_n de até 50 kDa e IP da ordem de 2, enquanto Loeker et al., (2004) formaram policaprolactona com M_n de 12 a 37 kDa e IP de 1,4 a 1,6. De acordo com a revisão de Albertsson e Srivastava (2008) a M_n de 50 kDa foi a maior massa molecular reportada para polimerização por abertura de anel utilizando enzimas. A falta de controle sobre a massa molecular detectada pelos autores (IP da ordem de 2) foi atribuída às reações de transesterificação, conforme já observado para e-ROP enzimática em solventes convencionais (THURECHT et al., 2006).

Além do uso na polimerização, o scCO₂ tem sido estudado na degradação enzimática (lipase *Candida antarctica*) da policaprolactona na presença de pequenas quantidades de água (MATSUMURA et al.,

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

2001), ou acetona (TAKAMOTO et al., 2001). Ambos os autores, obtiveram oligômeros repolimerizáveis com massa molecular numérica média M_n de cerca de 500 Da. Matsumura et al., (2001) estudaram ainda a repolimerização dos oligômeros obtidos (500 Da), produzindo PCL com M_n superior a 80.000 Da (expresso em poliestireno) utilizando lipase de *Candida antarctica*.

No entanto, apesar de o CO_2 ser o fluido mais amplamente estudado como solvente para reações catalisadas por enzimas, ele pode ter um efeito deletério sobre essas (OLIVEIRA et al., 2006; HABULIN; KNEZ, 2001; KAO et al., 1997). As características hidrofílicas do dióxido de carbono ao longo de amplas faixas de pressão pode alterar a distribuição da água entre a enzima e a mistura de reação, ou seja, o CO_2 pode retirar a água essencial do microambiente da enzima causando sua desativação (MONHEMI; HOUSAINDOKHT, 2012; HABULIN; KNEZ, 2001). Alguns autores acreditam ainda que o CO_2 forme complexos covalentes com os grupos amina livres da superfície da enzima, removendo as cargas dos resíduos de lisina e afetando assim a atividade da enzima (KAMAT et al., 1992; KAMAT et al., 1995; HABULIN; KNEZ, 2001). Além disso, o CO_2 pode reduzir o pH do meio reacional devido à produção de ácido carbônico pela reação com a água contida na enzima (HOBBS; THOMAS, 2007). Todos estes fatores associados ao uso de CO_2 como solvente podem reduzir a atividade enzimática durante as reações.

Soma-se a isso, o fato de que a rápida liberação do CO_2 dissolvido na água ligada da enzima, devido à diminuição da pressão durante a despressurização do reator pode produzir mudanças na estrutura da enzima. Tais mudanças causam a inativação da enzima e comprometem sua reutilização (NAKAMURA, 1990; LIN et al., 2006).

Pelo exposto até aqui fica claro que a busca por novos fluidos comprimidos com menores impactos negativos sob as reações de biocatálise, são de grande interesse no panorama atual de e-ROP mediada por fluidos comprimidos.

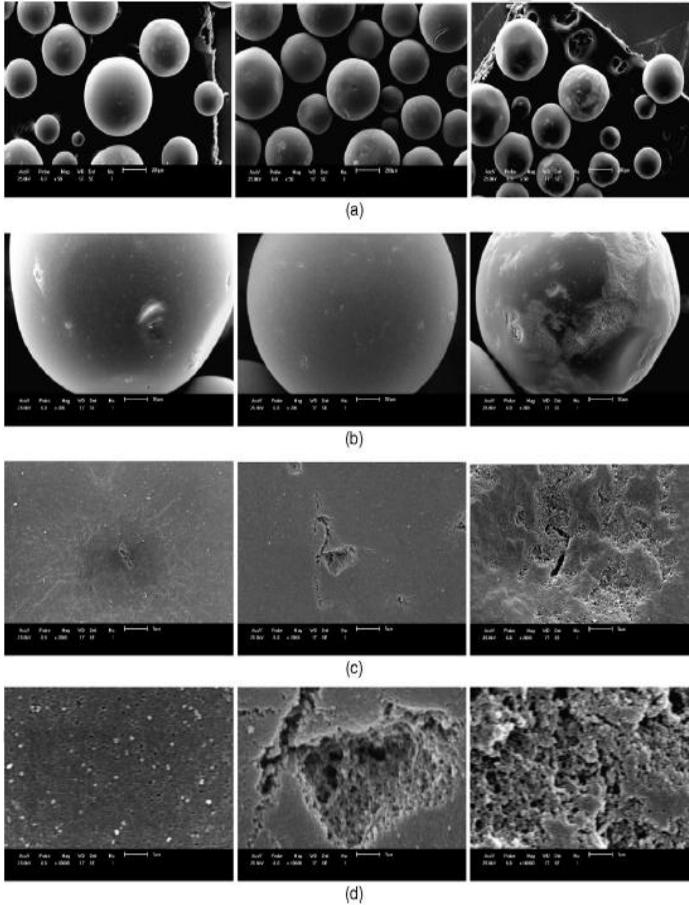
Neste contexto, pode-se citar o trabalho de Oliveira et al. (2006), os quais investigaram a atividade da *Candida antarctica* – fração B (Novozym 435) submetida à ação do dióxido de carbono, do propano e do n-butano comprimidos. Nesse estudo foram observadas perdas para a atividade da enzima sob tratamento com dióxido de carbono, enquanto o uso de propano e de n-butano promoveu um aumento na atividade da enzima. Neste trabalho os autores também observaram que a exposição da enzima ao CO_2 promoveu alterações estruturais na enzima imobilizada, que não ocorreram quando a enzima foi exposta ao n-

butano e propano. Isso pode ser observado na Figura 2.9 que mostra micrografias eletrônicas de varredura comparando a enzima não tratada com enzimas tratadas em n-butano e em dióxido de carbono (OLIVEIRA et al., 2006). Nesta figura observa-se que o tratamento da enzima com CO₂ promove uma degradação expressiva do suporte polimérico da enzima, o que é observado em menor grau quando do uso de n-butano. Os autores afirmam ainda que o propano e o butano possuem características hidrofóbicas que preservam a água essencial do microambiente da enzima promovendo aumento da atividade enzimática da Novozym 435.

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

Figura 2.9 - Micrografias eletrônicas de varredura de Novozym 435: (a) amplificação de 50 vezes, (b) amplificação de 200 vezes, (c) amplificação de 2000 vezes e (d) amplificação de 10.000 vezes. Observa-se da esquerda para a direita, as Micrografias eletrônicas referentes à enzima não tratada, tratadas em butano e em dióxido de carbono, respectivamente. Nos dois últimos casos as condições são: temperatura de 75°C, tempo de 6 horas, densidade reduzida de 1,6 e pressão de 276,4 bar.

Fonte: Oliveira et al. (2006).



2.5 REATOR CONTÍNUO VERSUS REATOR EM BATELADA PARA e-ROP DE ϵ -CL

Uma vasta lista de fatores tem sido estudada por diferentes pesquisadores nas reações de e-ROP visando aumentar a massa molar e a conversão monomérica das reações, tais como: tipo e concentração de enzima; tipo e quantidade de iniciador da reação; temperatura e pressão do sistema; tempo de reação e tipo de solvente empregado; modo de operação dos reatores, batelada ou contínuo (ROSSO COMIM et al., 2013; SANTOS et al., 2012; ZHANG et al. 2012; KUNDU et al. 2011; LABET e THIELEMANS, 2009; GEUS, 2007; THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; MEI et al., 2003; MEI et al., 2002; GROSS et al., 2001; KUMAR e GROSS, 2000). Este esforço conjunto tem promovido importantes progressos nesta linha de pesquisa além de nortear inúmeras escolhas em relação às melhores condições reacionais para reações de e-ROP.

Entretanto, os únicos trabalhos relatados na literatura para e-ROP de ϵ -caprolactona em modo contínuo são os trabalhos de Zhang et al. (2012) e Kundu et al. (2011), ambos realizados em pressão atmosférica e usando tolueno como solvente nas reações. Zhang et al. (2012) usando uma lipase imobilizada de *candida sp* (LH-HA 703), obteve polímeros da ordem de M_n 15.6 kDa e IP de 2.1 a temperaturas de 40 °C enquanto Kundu et al. (2011) usando a lipase Novozym 435, obteve polímeros na ordem de $M_n \pm 16$ kDa a temperatura de 70 °C (dados de IP não foram apresentados).

Contudo, no que tange a produção de policaprolactona via e-ROP utilizando fluidos pressurizados como solvente (tema do presente trabalho), todos os trabalhos foram realizados em batelada, em reatores/autoclaves de volume constante (SANTOS et al., 2012; TURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004) e mais recentemente em reator batelada de volume variável (ROSSO COMIM et al., 2013). Cabe salientar que, entre estes estudos citados, Thurecht et al. (2006) obtiveram os melhores resultados de massa molar para e-ROP de ϵ -caprolactona, atingindo uma conversão de 100%, M_n de 50 kDa e IP de 2,0 após 50 horas de reação em batelada.

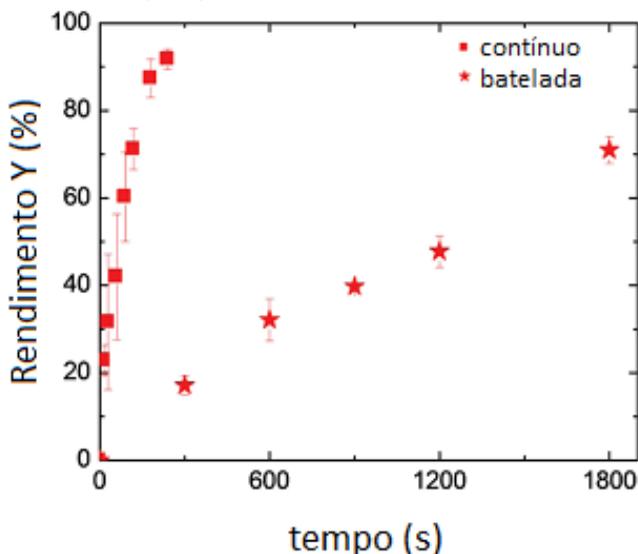
No entanto deve-se destacar que a escolha do tipo de reator para conduzir o processo de polimerização exerce forte influência na qualidade do polímero final obtido e na viabilidade econômica do processo (ZHANG; RAY, 2002). Gross et al. (2001) e Kobayashi (2009) relatam importantes inconvenientes em reações de e-ROP realizadas em reator batelada, como: grande quantidade de enzimas com

baixa estabilidade operacional, baixa produtividade dentro de uma escala de tempo prático e complexo processo de operação. Estes foram reconhecidos como os principais fatores que limitam a utilização de lipases nas reações de e-ROP em reator batelada para grande escala.

Neste contexto, experimentos realizados por Kundu et al. (2011) comparando rendimentos (Y %) de reações de e-ROP de ϵ -caprolactona em função do tempo (s) em reatores contínuo e batelada sob mesmas condições de trabalho (T e P) e concentração de enzima (Figura 2.10) demonstraram maior eficiência para o reator em modo contínuo. Neste sentido Kundu et al. (2011) obteve rendimentos de 70 % para as reações realizadas em sistema contínuo após 2 minutos de reação enquanto que, para o sistema em batelada o mesmo rendimento só foi obtido após 30 minutos de reação (Figura 2.10).

Figura 2.10 - Comparação entre rendimentos (Y) das reações de e-ROP de ϵ -caprolactona para os reatores contínuo e batelada.

Fonte: Kundu et al., (2011).



As reações de e-ROP realizadas em reatores de batelada podem ainda apresentar dificuldades de homogeneização (da mistura de reação) entre as fases sólida (enzima) e líquida (monômero + solvente) (ROSSO COMIM et al., 2013). Devido ao aumento da viscosidade do sistema

com a polimerização, a difusividade das cadeias poliméricas diminui, nesses casos, a mistura ineficiente nestes reatores pode levar a limitações na propagação das cadeias poliméricas (KUNDU et al., 2011). O tipo de agitação usado no reator batelada limita ainda as reações ao uso de baixas razões mássicas de enzima/substrato, podendo levar ao rompimento (por tensão mecânica) do suporte polimérico e perda das enzimas encapsuladas.

Por outro lado, as reações em modo contínuo são geralmente mais vantajosas, incluindo baixo custo, ótimo controle do processo, alta produtividade e facilidade de operação (ZHANG et al., 2012). O reator de leito empacotado (PBR), por exemplo, pode ser utilizado vantajosamente para a catálise heterogênea, em especial para as reações catalisadas por enzimas devido ao fácil contato (do substrato com a enzima) e subsequente separação (do produto). Além disso, a remoção contínua de substâncias inibidoras facilita a reutilização da enzima, sendo esse reator mais adequado para produções em longo prazo e em escala industrial, assim como para maior razão mássica de enzima/substrato, sendo mais rentável do que as operações convencionais em batelada (LAUDANI et al., 2007). Além disso, reatores contínuos de baixo custo e com estruturas flexíveis/ajustáveis para modificações ou aumento de escala (como o reator desenvolvido no presente trabalho) são de extrema importância no setor industrial.

2.6 USO DE ULTRASSOM EM E-ROP

As ondas sonoras dos equipamentos de ultrassom são ondas mecânicas produzidas por deformações provocadas pela diferença de pressão em um meio elástico ou deformável como ar, metais, isolantes, água, entre outros. Estas ondas necessitam de um meio para se propagar, isto é, não se propagam no vácuo (MAIA et al., 2000), causando efeitos mecânicos, térmicos e cavitacionais no meio em que se propagam (HA et al., 2010). O fenômeno responsável pela formação e subsequente colapso de microbolhas de gás em um líquido é conhecido como cavitação. A cavitação é a principal responsável pelos efeitos sonoquímicos (MIZUKOSHI et al., 1999). Quando atinge um tamanho crítico, a cavidade implode, liberando calor e pressão muito elevados em intervalos muito curtos de tempo e em locais específicos do líquido (KORN et al., 2003). Esta energia liberada pela implosão das microbolhas pode ser utilizada para induzir reações químicas que não seriam alcançadas em condições convencionais, aumentar a velocidade de transferência de massa, aumentar taxas de conversão de produtos e

contribui para o aumento da atividade catalítica (SUSLICK, 1988; LEE et al., 2008; YACHMENEV et al., 2009; HA et al., 2010).

A utilização de ultrassom em reações químicas, bem como em outras áreas da ciência, tem sido considerada uma tecnologia "verde" devido à sua alta eficiência, baixos requisitos instrumentais, redução significativa do tempo de processamento em comparação com outras técnicas convencionais e por, geralmente, possuir um desempenho economicamente viável (MASON, 2007).

Devido a isso, muitos estudos vêm sendo conduzidos com o objetivo de avaliar o real efeito das ondas ultrassônicas na síntese polimérica. No entanto, o uso de ultrassom em reações de e-ROP tem sido pouco explorado até o momento. Neste contexto, os trabalhos de Gumel e seus colaboradores (GUMEL et al., 2012^a; GUMEL et al., 2012b; GUMEL et al., 2013) merecem atenção por demonstrarem a eficiência das ondas ultrassônicas na síntese de homopolímeros e copolímeros. Nesses trabalhos os autores (GUMEL et al., 2012b; GUMEL et al., 2013) demonstraram que a irradiação ultrassônica aumentou a velocidade de propagação das cadeias poliméricas e melhorou a transferência de massa do sistema em reações de e-ROP de ϵ -CL catalisadas pela lipase Novosym 435. Ainda, a comparação com as reações convencionais não sonicadas mostrou que o uso do ultrassom aumentou a conversão monomérica e massas moleculares (M_n e M_w) e permitiu a obtenção de um produto polimérico de distribuição mais estreita de massas moleculares (menor IP) além de um elevado grau de cristalinidade.

2.7 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

Preocupações ambientais acarretadas pela contaminação do solo e de lençóis freáticos, bem como a poluição visual causada pelo acúmulo de lixo oriundo em grande parte de materiais poliméricos, vem fazendo dos plásticos o grande “vilão do meio ambiente” no século XXI.

A incineração foi, por algum tempo, a solução para estes resíduos plásticos, mas esta ocasiona sérios problemas ambientais, como o aumento do aquecimento global e a liberação de elementos nocivos à atmosfera, e conseqüentemente ao ser humano (BAUMANN, 1998). Com a reciclagem é possível minimizar o consumo de matérias-primas, a poluição e o volume de lixo. No entanto, em 2011 o reciclo de plásticos pós-consumo no Brasil foi de apenas 21,7 % (PLASTIVIDA, 2012). Neste contexto, busca-se um material com maior durabilidade em uso e com rápida degradabilidade após o descarte.

Este fato, somado à crescente demanda por novos materiais biocompatíveis, usados pela *engenharia de tecidos* como implantes biomédicos (materiais que permitam a redução do risco de infecções e/ou do número de cirurgias para o paciente), ou pelo setor farmacêutico como veículo de transporte para liberação controlada de fármacos, vêm alavancando de forma vertiginosa as pesquisas na área de polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis nas últimas duas décadas.

Dentre os polímeros capazes de atuar em ambas as áreas mencionadas anteriormente (ecológica e médica) pode-se destacar a policaprolactona (PCL) como um dos mais atrativos e úteis como poliésteres biodegradáveis.

Neste contexto, a rota mais bem vista e aceita atualmente entre os pesquisadores para a obtenção de polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis (ex. PCL), com potencial uso para as áreas biomédica, alimentícia e farmacêutica, têm sido a *polimerização por abertura de anel catalisada por enzimas* (e-ROP), a qual evita a utilização de catalisadores organometálicos tóxicos e promove um ótimo exemplo de “química verde de polímeros”.

O uso de fluidos pressurizados como o scCO_2 (ROSSO COMIM et al., 2013; SANTOS et al., 2012; THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004) e o GLP (ROSSO COMIM, 2013), como solventes na e-ROP de ϵ -caprolactona, têm contribuído ainda, para tornar a produção de policaprolactona um processo limpo. Isso ocorre porque o emprego de fluidos pressurizados como solventes possibilita sua fácil separação da mistura polimérica no momento da despressurização, podendo assim ser reutilizado no processo.

Outro bom candidato como solvente para produção de polímeros limpos é o diclorometano (DCM), que por sua vez vem sendo usado com grande êxito na produção de polímeros e *scaffolds* pela comunidade científica (ELOMAA et al., 2011; XIE et al., 2009; CHEW et al., 2008; SANGSANOH et al., 2007; YANG et al., 2005; KWON et al., 2005). Isso porque o DCM pode ser fácil e completamente separado dos polímeros ou *scaffolds* após seu processamento, por uso de vácuo a temperaturas ambientes. Destaca-se ainda que, durante a produção de polímeros, um correto sistema de coleta e armazenamento do DCM resulta na possibilidade de reuso deste no sistema.

Até o presente momento, a produção de polímeros biorreabsorvíveis e/ou biodegradáveis, pela metodologia de e-ROP, usando fluidos pressurizados como solventes, tem sido realizada em sua totalidade por sistemas de reatores em batelada. No entanto, processos realizados em modo contínuo são geralmente mais vantajosos, incluindo

Capítulo 2: Revisão Bibliográfica

baixo custo, ótimo controle do processo, alta produtividade e facilidade de operação (ZHANG et al., 2012).

No “panorama” atual de demanda por polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis, a possibilidade de produção em larga escala de tais materiais é de vital importância para uma maior disseminação/aplicação desta tecnologia no setor acadêmico e industrial. A produção em larga escala de polímeros biodegradáveis pode torná-los competitivos economicamente frente aos materiais poliméricos (não biodegradáveis) usados atualmente em diversos setores privados como: áreas médica, farmacêutica e alimentícia, bem como nos setores de embalagens e/ou materiais de uso periódico oriundos de polímeros como, polietileno tereftalato (PET), polietileno de baixa/alta densidade (PEAD e PEBD), polipropileno (PP), poliestireno (PS) e etc.

Neste “cenário” de ampla acessibilidade para tecnologias “verdes” que supram a carência por materiais poliméricos biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis, ecologicamente corretos, pode-se afirmar que, tanto o foco deste estudo como as tecnologias/ferramentas adotadas para atingir os objetivos do mesmo, são de vital importância dentro da área de biopolímeros, podendo promover a obtenção de produtos de alta pureza e valor agregado.

CAPÍTULO 3: MATERIAL E MÉTODOS

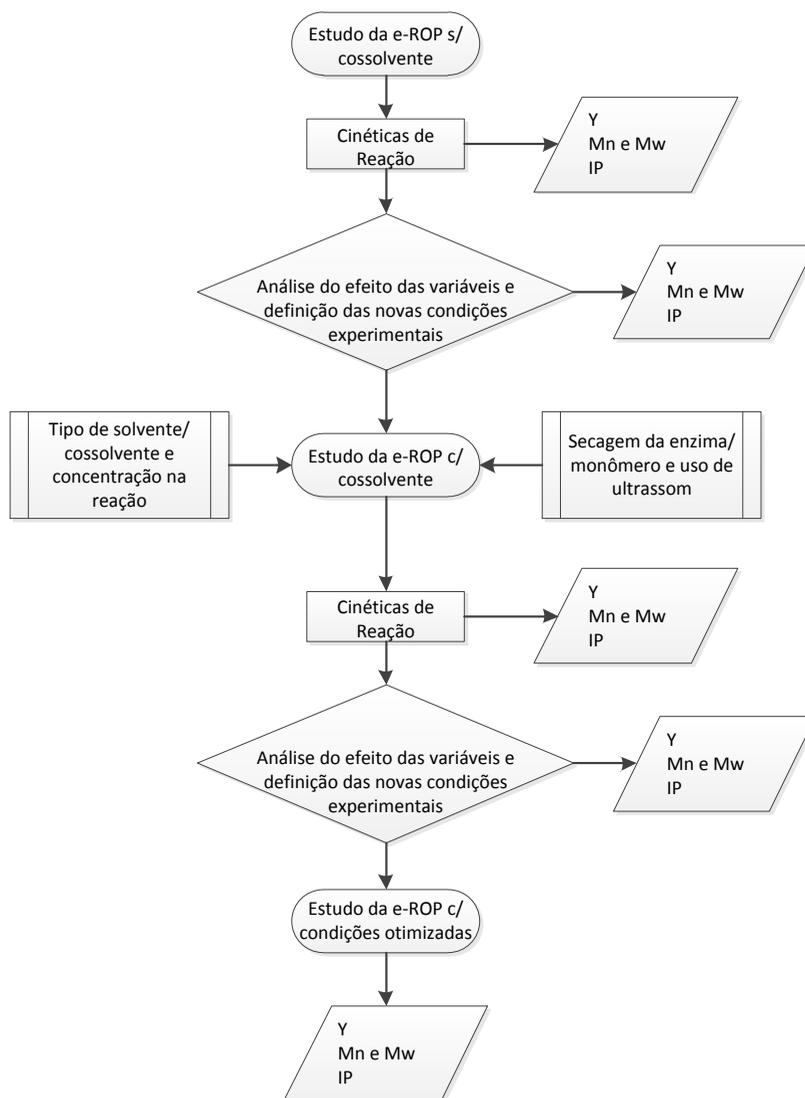
Neste capítulo são apresentados os materiais, bem como o procedimento experimental empregado para a realização das reações de e-ROP de (ϵ -caprolactona) em sistema contínuo e meio pressurizado.

De forma a facilitar o entendimento da sequência metodológica adotada para a produção de policaprolactona em modo contínuo, realizada no presente trabalho, um fluxograma das etapas experimentais realizadas é apresentado na Figura (3.1).

Este fluxograma apresenta as três principais etapas adotadas visando à definição das melhores condições operacionais para a produção de PCL em modo contínuo. As respostas avaliadas em cada etapa realizada foram os rendimentos de reação (Y), massas moleculares (M_n e M_w) e índice de polidispersão (IP). A primeira etapa deste trabalho é dada pela realização de reações de e-ROP sem cossolvente e sem a secagem da água presente na enzima e nos reagentes empregados. A segunda etapa experimental é representada pelas reações de polimerização com cossolvente, as quais foram realizadas a partir das melhores condições experimentais obtidas na etapa anterior. Cabe salientar que nesta etapa do trabalho diversas variáveis foram analisadas objetivando maximizar a eficiência da produção de PCL em modo contínuo. Neste sentido, foram avaliados os seguintes efeitos nas reações de e-ROP de ϵ -CL: a) Secagem da água livre presente nas enzimas e no monômero utilizado; b) Definição do melhor cossolvente a ser utilizado nas reações de polimerização; c) Efeito de ondas ultrassônicas sob as reações de e-ROP de ϵ -CL; d) Efeito da concentração de monômero/cossolvente nas reações; e) Efeito do uso de n -butano como solvente nas reações de polimerização em detrimento do $scCO_2$. Finalmente, a terceira etapa do presente trabalho foi elaborada a partir das melhores condições experimentais obtidas nas etapas 1 e 2. Esta etapa visou à produção de policaprolactona, sob condições otimizadas, para longos tempos de reação realizados com a mesma carga de enzimas. Estes experimentos tiveram como objetivo demonstrar a viabilidade técnica da produção enzimática de policaprolactona em sistema contínuo utilizando as metodologias adotadas e/ou desenvolvidas neste trabalho.

Figura 3.1 - Fluxograma da Sequência Metodológica Experimental adotada.

Fonte: O autor.



3.1 MATERIAL

O monômero utilizado para as reações de polimerização foi a ϵ -caprolactona de fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$, massa molecular de 114,14 Da e com teor de pureza de 97 % (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

O dióxido de carbono (CO_2) e o n-butano foram adquiridos da White Martins S.A com pureza de 99,9 % e 99,5 % respectivamente.

O biocatalisador escolhido para as reações de polimerização foi a lipase Novozym 435. Esta enzima imobilizada possui diâmetro médio de partículas de 0,4 mm, área superficial BET de $130\text{ m}^2/\text{g}$, diâmetro médio de poros de 15 nm e volume médio de poros de 0,5 mL/g (Conforme especificações fornecidas pelo fabricante).

Os solventes etanol (anidro) e tetrahidrofurano (THF – Grau de pureza para HPLC) foram obtidos junto a Merck, ambos com teor de pureza de 99,9 %. O diclorometano (DCM) foi obtido pela FMaia com pureza de 99,5 % enquanto o tolueno foi adquirido da Sigma-Aldrich com teor de pureza de 99,5 %.

As peneiras moleculares tipo 4Å (tamanho do poro: 4Å, composição: 1 Na_2O : 1 Al_2O_3 : 2,0 \pm 0,1 SiO_2 : x H_2O) foram obtidas da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

3.1.1 Tratamento dos materiais

O excesso de água (nucleófilo iniciador da reação) no meio reacional de e-ROPs pode resultar numa série de reações secundárias (formação de cadeias cíclicas ou hidrólise das cadeias) levando à diminuição da massa molar e aumento da polidispersão nos polímeros (THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; MEI et al., 2003). No entanto, a diminuição excessiva de água no meio pode levar à perda da atividade enzimática ou falta de iniciador das reações e, por conseguinte, afetar as reações de e-ROP levando a uma diminuição no rendimento das reações e/ou na massa molar (KUNDU et al. 2011).

Enquanto em reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em modo de batelada essa tarefa (de controle sobre a quantidade ótima de água no meio) pode ser facilmente definida pela secagem do catalisador e dos reagentes e posteriores análises dos resultados obtidos na reação como rendimento e massas moleculares (THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; MEI et al., 2003), para sistemas contínuos essa tarefa pode ser algo muito longe da trivialidade (KUNDU et al. 2011), pois um controle inadequado na quantidade de água fornecida constantemente ao

Capítulo 3: Material e Métodos

meio reacional pelos reagentes (que fluem continuamente para dentro do reator) pode levar a uma perda da água de monocamada das enzimas (causada pelo uso desta água como iniciador nas reações de e-ROP) levando a uma diminuição da atividade enzimática, o que afeta diretamente os produtos das reações de e-ROP.

Por outro lado, o uso de água além da quantidade ótima, como mencionado anteriormente, conduzirá a reações secundárias (por exemplo, a hidrólise) que afetam as reações de e-ROP (THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; MEI et al., 2003).

Assim, com o objetivo de estabelecer um controle no teor de água fornecida ao meio reacional foram realizadas etapas de secagem da água presente nas enzimas e no monômero (através de uma estufa a vácuo) utilizado no presente trabalho. A secagem das enzimas foi realizada em temperaturas de 40 °C e 70 °C em diferentes tempos de secagem visando à obtenção de diferentes teores iniciais de água. Já o monômero foi seco na temperatura de 100 °C e 0,1 bar por 24 h (condição muito próxima da temperatura de transição de fases líquido-vapor deste monômero de acordo com o fabricante) visando a máxima secagem deste reagente. Os demais reagentes (THF, DCM, etanol e tolueno) foram utilizados sem nenhum tratamento prévio ao seu emprego nas reações.

O teor de água (%) nos reagentes (monômero e solventes) e na enzima (1, 2, 3 e 4) antes e/ou após o procedimento de secagem, foi obtido por análises em Karl Fischer realizadas pela Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. Os teores de água, bem como as condições operacionais das secagens como: temperatura, pressão e tempo são apresentados na Tabela (3.1).

Após a secagem todos os reagentes e enzimas foram acondicionados em frascos âmbar (com batoque e tampa) e mantidos dentro de dessecadores com peneira molecular (4 Å) no fundo destes, para evitar o aumento da quantidade de água nos mesmos. As peneiras moleculares foram ativadas previamente ao uso, de acordo com Ignachewski et al. (2010).

Análises de Karl Fischer demonstraram a constância dos teores de água dos reagentes e enzimas com o passar do tempo de armazenagem nos dessecadores.

Tabela 3.1 -Teores de água obtidos antes e/ou após a secagem dos reagentes e enzima.

Material	Condições operacionais			Teor de água (%)	
	tempo (h)	Temperatura (°C)	Pressão (bar)	antes da sec.	após a sec.
Enzima (1) ^a	1,0	40	1,0	2,500 ^b	2,000
Enzima (2)	1,0	40	1,0	1,500 ^b	1,150
Enzima (3)	16	70	0,4	1,500	0,690
Enzima (4)	24	70	0,4	1,500	0,280
Enzima (5)	48	70	0,4	1,500	0,100
Monômero	24	100	0,1	0,080	0,040
DCM	- ^c	-	-	0,040	0,040
THF	-	-	-	0,038	0,038
Tolueno	-	-	-	0,041	0,041

^a Numeração dada para distinguir os diferentes teores de água obtidos para as enzimas.

^b Diferença oriunda de diferentes lotes de Novozym 435.

^c Usados sem tratamento prévio.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Aparato Experimental usado para a obtenção da poli(ϵ -caprolactona) em modo contínuo

As reações de polimerização a alta pressão em modo contínuo foram realizadas em uma unidade experimental (Figura 3.2) desenvolvida como parte dos objetivos propostos no presente trabalho. Esta unidade experimental encontra-se montada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) da UFSC. As informações referentes ao projeto e desenvolvimento, bem como dos equipamentos e dispositivos auxiliares desta unidade experimental são apresentadas em maior detalhe no Apêndice (A) desta Tese. Os principais componentes da unidade experimental são apresentados esquematicamente na Figura (3.3).

Figura 3.2 – Vista geral da Unidade Experimental.

Fonte: O autor.

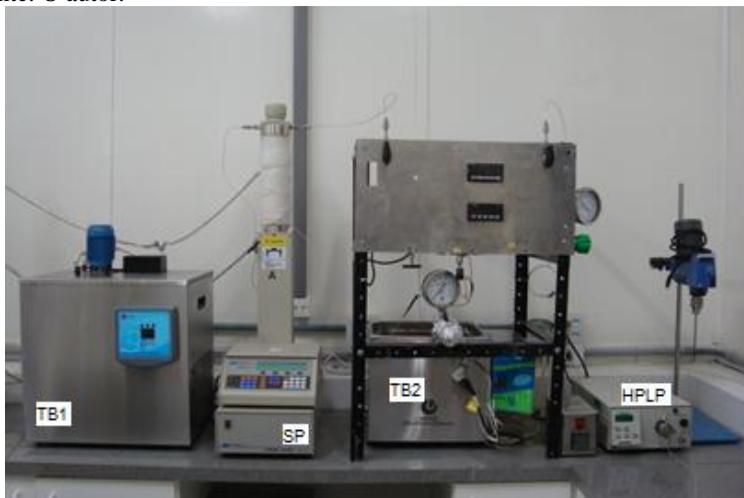
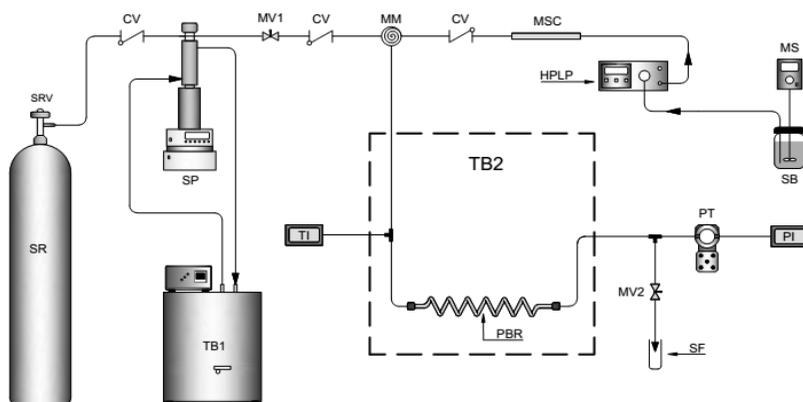


Figura 3.3 – Aparato Experimental para polimerização de ϵ -caprolactona em modo Contínuo, legenda: SR – reservatório de solvente, TB1 – banho termostático, TB2 – banho ultrassônico, SP – bomba seringa, HPLP – bomba de alta pressão de líquidos, TI – indicador de temperatura, PBR – reator empacotado com enzimas, PT – transdutor de pressão, PI – indicador de pressão, MS – agitador mecânico, SB – recipiente com substrato, SF – fraco coletor de amostra, MSC – coluna de peneiras moleculares, MM – micro-misturador, CV – *check valve*, válvula de via única, MV – válvula agulha.

Fonte: O autor.



3.2.1.1 Procedimento experimental

O procedimento experimental consiste nas seguintes etapas: primeiramente o banho (TB1), conectado à bomba de alta pressão (SP), é regulado na temperatura de 5°C (com objetivo de facilitar a liquefação do CO₂ para um maior armazenamento deste, assim como manter a temperatura constante no reservatório de solvente da bomba) e as válvulas MV1 e MV2 são fechadas para evitar a perda de CO₂ durante o abastecimento do reservatório (usado para armazenamento do solvente) de (SP). Após o banho termostático (TB1) atingir a temperatura estabelecida, a válvula (SRV) conectada ao cilindro de gás é aberta e adiciona-se uma carga deste solvente na bomba (SP), a fim de que o gás seja liquefeito. O banho termostático (TB2) é acionado na temperatura estabelecida para realização do experimento (65 °C) e o recipiente contendo o monômero (ϵ -caprolactona) é conectado à bomba de líquidos (HPLP). Enquanto o banho termostático (TB2) alcança a temperatura desejada, o reator (PBR) é preenchido (completamente) com $4,8 \pm 0,07$ g de enzima (Novozym 435) por aplicação de vácuo em uma das extremidades do reator, enquanto a outra extremidade é imersa em um recipiente (Becker) com a enzima (previamente seca em estufa) previamente pesada em balança analítica. A massa de enzimas usada para empacotar completamente o PBR é obtida pela diferença entre as massas inicial (antes do empacotamento) e final (após o empacotamento) do recipiente com as enzimas. Realizado o empacotamento (procedimento realizado em ± 15 min.), o reator PBR é acoplado ao sistema reacional e imerso no banho termostático (TB2). A massa de enzimas necessária para o completo enchimento do reator foi obtido pelo enchimento em triplicata de um tubo de nylon (transparente) de mesmas dimensões (de comprimento e diâmetro interno).

Com o aparato pronto para operação inicia-se o aumento da pressão (da linha até a válvula MV1) lentamente utilizando a bomba (SP) em modo de pressão constante, até atingir-se a pressão desejada para cada experimento. Esta pressurização é realizada pelo solvente (fluido comprimido, ex. CO₂) usado para cada experimento.

Depois de atingida a pressão desejada, a válvula MV1 é lenta e cuidadosamente aberta e a linha e o reator são completamente enchidos e pressurizados na condição de pressão estabelecida para o experimento até a válvula MV2. Após atingir a pressão desejada, a bomba (SP) é ajustada e iniciada para o modo de fluxo constante e a vazão desejada (de solvente) para cada experimento é ajustada. Em seguida, a válvula MV2 é regulada para manter constantes o fluxo de solvente e a pressão

interna no reator. Após ajustada, a válvula MV2 fica aberta permanentemente com o fluxo desejado. Em seguida, aciona-se a bomba de líquidos (HPLP) que bombeia o reagente (monômero) ou mistura de reagentes ¹MIX (monômero + cossolvente) a uma vazão pré-estabelecida para cada experimento. A preparação das misturas (MIX) é realizada no reservatório de reagentes (SB) de acordo com a seção (3.2.1.2.1). A mistura entre o monômero ou MIX (monômero + cossolvente) com o solvente (scCO₂) é realizada pelo micro-misturador (MM).

O tempo necessário para realização dos procedimentos experimentais iniciais até a mistura entre o monômero e o solvente é de ± 40 min.

Durante os experimentos, monitora-se/ajusta-se constantemente a vazão e pressão da bomba (SP), a pressão (PI), a temperatura de entrada do monômero no sistema (TI) e a vazão da válvula MV2 (para liberação contínua do produto obtido).

O produto (polímero + monômero não reagido + solvente e/ou cossolvente) obtido durante o 1º tempo espacial é descartado devido a possíveis diluições do sistema (variação das frações mássicas iniciais) pelo solvente usado para encher e pressionar inicialmente o sistema (linhas de alimentação e reator).

Em seguida acopla-se ao equipamento (após a válvula MV2), o recipiente para acondicionamento dos produtos das reações. Depois de cumprido o tempo espacial (ver item 3.2.2) necessário para amostragem do produto, este é obtido através da válvula MV2 e acondicionado em recipientes apropriados (frascos âmbar com tampa e batoque de plástico), os quais são previamente pesados e identificados com o objetivo de fornecerem dados para os cálculos posteriores.

Cada amostra obtida e acondicionada nos recipientes é equivalente a 1 (um) tempo espacial (τ) do substrato dentro do reator. Desta forma, cada recipiente possui uma massa de produto equivalente à massa de reagentes bombeados (pelas bombas SP e HPLP) durante o tempo de cada reação (tempo espacial).

Dois parâmetros importantes que determinam a viabilidade econômica da utilização de enzimas em aplicações comerciais são: a possibilidade de reutilização e vida útil prolongada das enzimas (KUNDU et al., 2011). Neste contexto, estudos da utilização de enzimas solvente tolerantes e de enzimas imobilizadas, permitindo a reutilização

¹ MIX = Mistura de Reagentes (ϵ -caprolactona + cossolvente).

do biocatalisador (FUKUDA et al., 2001), bem como a utilização destes biocatalisadores por maior espaço de tempo (vida útil prolongada das enzimas) em relação à enzimas in natura ou não tolerantes a solventes, tornaram possível o desenvolvimento de processos enzimáticos de baixo custo.

Em reações de e-ROP, a variação da eficiência da enzima durante a síntese em fluxo contínuo para um período prolongado de uso (grande quantidade de substrato processado pelas mesmas enzimas), pode ser avaliada a partir de dados experimentais de estabilidade de conversão (do monômero para polímero) e da massa molecular do polímero obtido em longos tempos de reação (KUNDU et al., 2011).

Neste contexto, foram realizados experimentos visando determinar a estabilidade da conversão e da massa molecular do polímero durante longos tempos de reação. Para tanto, as coletas das amostras foram realizadas pelo menos 6 (seis) vezes (equivalente a 6 tempos espaciais) para cada carga de enzima utilizada no PBR. Ou seja, ao findar os primeiros tempos espaciais (com o produto da reação acondicionado em um primeiro recipiente), um segundo recipiente é imediatamente acoplado ao equipamento para acondicionar o produto resultante do próximo tempo espacial e assim sucessivamente por pelo menos seis vezes.

Ao final do tempo total de reação, um recipiente contendo diclorometano (DCM) é acoplado à bomba de líquido (HPLP) e o DCM é bombeado para o sistema com intuito de retirar o remanescente de substrato da linha e do reator. Este procedimento foi adotado com intuito de evitar possíveis solidificações do polímero dentro do reator. Foi verificado experimentalmente que são necessários pelo menos seis (6) tempos espaciais de DCM fluindo pelo reator para retirar o excesso de produto final de dentro do PBR e evitar entupimentos devido à solidificação do polímero.

Depois de findado a alimentação de DCM pelo reator, o sistema é despressurizado manualmente pela válvula MV2 e as bombas são desligadas. O sistema é aberto e o reator é desconectado do sistema e esvaziado/limpo para a próxima reação. O conteúdo do reator (enzimas) é lavado com THF e apropriadamente armazenado para posterior análise de atividade residual dessas ²enzimas de acordo com o método descrito por Oliveira et al. (2006), Fiametti (2008) e Krüger (2010). Já a mistura

² Este procedimento de análise de atividade residual das enzimas foi realizado apenas para os experimentos preliminares (Produção de PCL sem cossolvente).

resultante das reações de polimerização (polímero+solvente+monômero não reagido) é precipitada em etanol a temperatura de $\sim 0\text{ }^{\circ}\text{C}$ (usado como anti-solvente) com o objetivo de obter-se as massas de polímero produzido e monômero não reagido usados nos cálculos de rendimento de reação (Y %).

Para as reações realizadas com o uso de ultrassom em modo contínuo as reações seguiram o mesmo procedimento descrito previamente. A única diferença foi que o ultrassom acoplado ao banho termostático (TB2) com uma potência de 270 watts (RMS) foi mantido ligado durante todo o tempo de reação.

3.2.1.2 Tempo espacial

As reações cinéticas foram realizadas em termos de conversão do monômero (ϵ -CL) para polímero (PCL) como uma função do tempo espacial (do inglês “space time”). Este tempo é dado como o tempo necessário para que um dado volume de reagentes (volume suficiente para encher completamente o reator) possa entrar e sair completamente do reator (FOGLER e GURMEN, 2008).

O tempo espacial (τ) é dado pela porosidade do leito (ϵ_L) multiplicado pelo volume real do reator sem enzimas (V_R) e dividido pela vazão de alimentação de substrato (monômero + solvente) (q_A) de cada experimento, de acordo com a seguinte equação.

$$\tau = \frac{\epsilon_L V_R}{q_A} \quad (3.1)$$

onde, $\epsilon_L = \frac{V_e}{V_R}$, V_e (volume do reator cheio com enzimas) e V_R (volume do reator sem enzimas). V_e e V_R foram obtidos respectivamente escoando-se etanol através do reator totalmente empacotado com enzimas e através do reator vazio (sem enzimas) em triplicata. Dessa forma, ϵ_L foi estimado experimentalmente como sendo de $0,79 \pm 0,01$. O resultado obtido experimentalmente neste trabalho foi similar ao proposto (0,779) por Rosa et al. (2009).

Nos cálculos de tempo espacial, as densidades do monômero (ϵ -caprolactona) e do cossolvente (DCM, tolueno, THF) foram considerados constantes para simplificação dos cálculos. Já as densidades dos fluidos comprimidos (CO_2 e n-butano) foram calculadas com a equação de estado cúbica de Peng-Robinson.

3.2.1.3 Preparação das misturas de reagentes (MIX)

Como mencionado anteriormente (seção 3.1.1) a água exerce um papel muito importante na e-ROP de ϵ -CL, e um cuidado especial deve ser tomado no manuseio dos reagentes ou preparação de misturas destes (MIX) para que a quantidade de água nos reagentes de entrada seja constante com o passar do tempo de reação.

Neste contexto, a proposta original deste trabalho sugere o uso de peneiras moleculares empacotadas em MSC (Figura 3.3) para a secagem dos reagentes em fluxo contínuo. No entanto, em virtude da otimização do tempo de trabalho, bem como ao maior custo associado ao uso de peneiras moleculares para a secagem dos reagentes, estes foram secos em estufa a vácuo (ϵ -caprolactona) ou usados conforme recebido do fabricante (solventes e/ou cossolventes) de acordo com a seção (3.1.1).

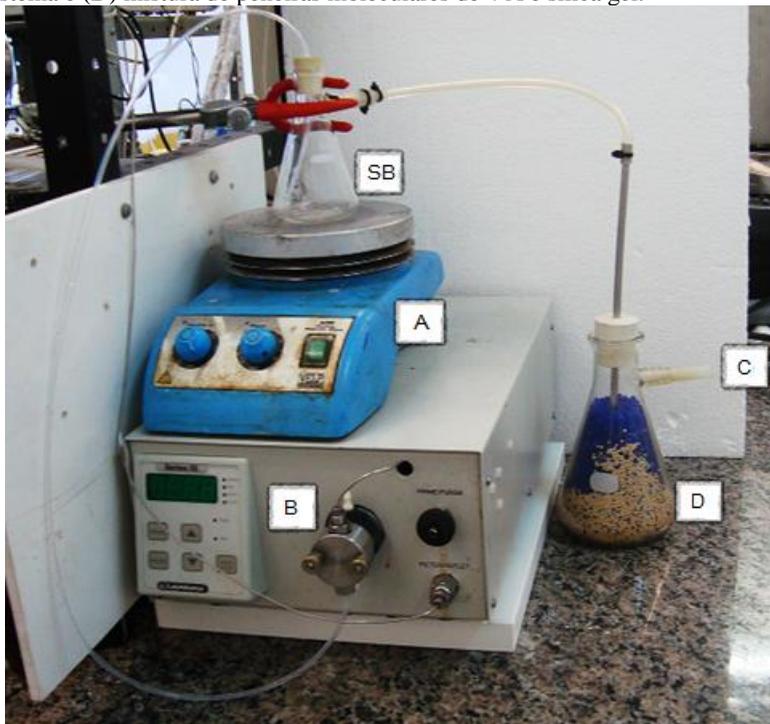
A preparação das misturas dos reagentes-MIX (ϵ -caprolactona + DCM) foi realizada no reservatório de reagentes (SB), onde para a manutenção da quantidade de água na corrente de entrada de reagentes bombeada por HPLP utilizou-se um sistema simples de secagem do ar de entrada em SB de acordo com a Figura (3.4). Este sistema (Figura 3.4) foi proposto devido a problemas com formação de vácuo em SB com o passar do tempo (pelo consumo dos reagentes em experimentos de maior tempo de reação) quando este era vedado por completo.

O vácuo em SB dificultava o bombeamento de reagentes pela bomba (HPLP) até o PBR devido a problemas de sucção na bomba ³HPLP e, por conseguinte perderam-se alguns experimentos. O uso do sistema de secagem (Figura 3.4) eliminou este problema de vácuo em SB.

³ Este tipo de bomba (HPLP) trabalha com sucção dos reagentes (e posterior bombeamento para o sistema) pelo uso de vácuo na cabeça da bomba, vácuo este produzido pelo pistão de cristal em constante fricção com as borrachas de vedação. Porém com o consumo contínuo dos reagentes e a formação de vácuo dentro do reservatório essa sucção é afetada e a bomba para de funcionar corretamente.

Capítulo 3: Material e Métodos

Figura 3.4 – Sistema de secagem do ar de entrada no PBR. Onde, (SB) reservatório de reagentes usados como substrato (MIX), (A) agitador magnético, (B) bomba usada para escoar os reagentes até o PBR, (C) entrada de ar no sistema e (D) mistura de peneiras moleculares de 4 Å e sílica gel.



Observa-se na Figura (3.4) que o ar de entrada em SB (C) deve passar primeiramente por uma camada de peneiras moleculares (4 Å) e sílica gel (D) com o objetivo de reter sua umidade (H_2O no ar) antes de chegar ao PBR.

Para a obtenção de diferentes quantidades de água (%) na mistura de reagentes (MIX) utilizou-se uma seringa de 10 mL para a inserção de água destilada em misturas (50 % de ϵ -CL + 50 % de DCM) com 0,04 % de água inicial (ver seção 3.1.1). Desta forma foram obtidas misturas (MIX) com quantidades de água de: 0,04 %, 0,09 %, 0,14 %, 0,54 % e 1,04 %.

Algumas amostras (misturas de ϵ -CL+DCM) dos reagentes inseridos no reservatório de reagentes (Figura 3.4) também foram coletadas no final dos experimentos para serem analisadas por Karl

Fischer. Para tais análises foram utilizadas 2 amostras de MIX (com 0,04 % de água inicial) usadas em reações de e-ROP por mais de 90 minutos e as análises de Karl Fischer demonstraram constância nos teores de água iniciais em MIX.

3.2.2 Determinação das massas moleculares dos polímeros

Para a determinação da massa molecular numérica média (M_n), massa molecular ponderal média (M_w) e índice de polidispersão (M_w/M_n) dos polímeros obtidos nas reações enzimáticas foram realizadas análises de GPC (Gel Permeation Chromatography). Essa técnica, também conhecida como SEC (Size Exclusion Chromatography), consiste no fracionamento das cadeias poliméricas de um polímero utilizando uma coluna (empacotada com um gel poroso) inserida no HPLC (High-Performance Liquid Chromatography). O princípio de fracionamento envolve a separação do polímero a ser analisado em um número muito grande de frações com diferentes massas moleculares. Essa separação ocorre quando uma solução é bombeada através da coluna recheada com o gel poroso. Este gel possui diâmetro de poros conhecidos. Ao penetrarem nestes poros, as cadeias menores percorrem um caminho maior que as cadeias maiores, atrasando-se com relação às outras. As cadeias de massa molecular maior serão eluídas primeiro, sendo seguidas pelas cadeias menores (CASTRO, 2006).

O equipamento utilizado para as análises de GPC do presente trabalho está localizado na Central Analítica da Universidade URI-Campus de Erechim, o qual consiste de um sistema modular HPLC AGILENT 1100 Series (Santa Clara, EUA). O cromatógrafo HPLC utilizado é composto de injetor automático de amostra (G1313A ALS), de degaseificador (DEGASSER G1379A), de bomba quaternária (G1311A) operando em modo isocrático, unidade de aquecimento (G1316A) e de detector por índice de refração (G1362A RID). Para as análises de GPC, foram utilizadas uma pré-coluna Plgel 5 μ m MiniMIX-C Guard (Agilent, Santa Clara, EUA) e duas colunas Plgel 5 μ m MiniMIX-C (Agilent, Santa Clara, EUA) todas ligadas em série. O volume de amostra injetado foi de 20 μ L e a fase móvel utilizada foi o tetrahydrofurano (THF) (Merck, 99,9 %, New Jersey, EUA) com vazão de 0,3 mL/min e temperatura da coluna fixa em 40 °C. As massas moleculares (M_n e M_w) foram calculadas usando uma curva de calibração de massa molecular (D_a) em função do volume de eluição (mL) realizada com padrões (amostras monodispersas) de poliestireno

(Fluka, St. Louis, EUA) de 500, 2000, 4000, 10.000, 30.000, 70.000 e 150.000 Da. As amostras foram injetadas na concentração de 0,1% (ROSSO COMIM, et al. 2013).

3.2.3 Determinação da atividade enzimática

A determinação da atividade enzimática foi realizada de acordo com o método descrito por Krüger (2010), Fiametti (2008) e Oliveira et al. (2006). A atividade enzimática foi obtida por meio da reação de esterificação entre o ácido láurico e o álcool n-propílico na razão molar de 3:1, à temperatura de 60°C com 5% (m/m) de enzima com relação ao ácido láurico. A reação foi conduzida em um reator de vidro aberto com agitação magnética (Fisatom, 753 A, São Paulo, Brasil) e sob a temperatura constante de 60 °C por meio de um banho termostático (Nova Ética, Vargem Grande Paulista, Brasil). Foram retiradas alíquotas de 150 µL do meio reacional contido no reator de vidro, em triplicata, no tempo zero (antes da inserção das enzimas) e após 40 minutos de reação. Estas amostras (alíquotas) foram então diluídas em 20 mL da solução acetona/etanol 1:1 e em seguida tituladas com hidróxido de sódio a 0,01 M até pH 11. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada levando-se em conta a diferença de volume de hidróxido de sódio 0,01 M titulado nas amostras obtidas antes (amostra controle ou branco) e depois da reação de esterificação. Neste procedimento, uma unidade de atividade enzimática (U) foi determinada como a quantidade de ácido láurico, em µmol, consumido por minuto nas condições experimentais descritas. A atividade de esterificação (U) da lipase imobilizada foi calculada pela Equação (3.2) (KRÜGER, 2010).

$$A_E(U) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3 \times V_f}{t \times V_e} \quad (3.2)$$

sendo:

A_E = atividade enzimática (µmol de ácido láurico/min)

V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL)

V_b = volume de NaOH gasto na titulação da amostra após o tempo t (mL)

M = molaridade da solução de NaOH (mol/L)

V_f = volume final do meio reacional (mL)

t = tempo de reação (min)

V_e = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL)

$1U$ = 1 μ mol de ácido láurico/minuto

A atividade enzimática específica (A_e) (U/g) foi obtida dividindo-se a atividade (U) pela massa de enzima imobilizada utilizada na reação, de acordo com a Eq. (3.3).

$$A_e(U/g) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3 \times V_f}{t \times V_e \times M_E} \quad (3.3)$$

sendo:

M_E = massa de enzima utilizada na reação (g)

De acordo com Krüger (2010), a atividade enzimática residual serve para avaliar o ganho ou perda de atividade da enzima depois da reação de polimerização, a qual foi obtida pela seguinte equação.

$$A_E \text{ Residual (\%)} = \frac{A_E \text{ após a reação}}{A_E \text{ antes da reação}} \times 100 \quad (3.4)$$

3.2.4 Condições experimentais empregadas nas e-ROPs de ϵ -CL realizadas em PBR

O estudo da produção enzimática de poli(ϵ -caprolactona) em sistema contínuo e meio pressurizado é um tema ainda inexplorado dentro da área de polímeros biodegradáveis/biorreabsorvíveis, podendo ser analisado em relação a diversos parâmetros e condições experimentais na busca por uma melhora quantitativa e/ou qualitativa na produção destes polímeros.

Desta forma, lançou-se mão da investigação experimental do efeito de diversas variáveis sob as reações de e-ROP de ϵ -caprolactona realizadas em modo contínuo. A Tabela 3.2 apresenta os níveis adotados para cada variável, bem como a seção (4.1, 4.2 e 4.3) em que foram apresentados os resultados (Capítulo 4) obtidos para cada experimento.

Tabela 3.2 – Condições experimentais empregadas nos ensaios de e-ROP de e-CL realizados em sistema contínuo. Onde: (Cossol.) cossolvente, (S:M) razão solvente/monômero, (MIX) mistura de e-CL + cossolvente, (S:MIX) razão solvente/MIX.

Seção	Entrada	Pressão (bar)	Temp. (°C)	Solvente	Cossol.	razão mássica			Quantidade de água (%)	
						S:M	MIX	S:MIX	na Enzima	na e-CL ou MIX
4.1	1	200	65	CO ₂	*	2:1	-	-	2,00	0,56
	2	200	65	CO ₂	-	1:2	-	-	2,00	0,56
	3	120	65	CO ₂	-	2:1	-	-	2,00	0,56
	4	120	65	CO ₂	-	1:2	-	-	2,00	0,56
4.2	5	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	1,15	0,04
	6	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	1:2	1,15	0,04
	7	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,69	0,04
	8	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,28	0,04
	9	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,10	0,04
	10	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,69	0,09
	11	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,69	0,14
4.3	12	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,69	0,54
	13	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,69	1,04
	14	120	65	CO ₂	THF	-	1:1	2:1	0,69	0,04
	15	120	65	CO ₂	tolueno	-	1:1	2:1	0,69	0,04
	16	120	65	CO ₂	DCM	-	2:1	2:1	0,69	0,04
	17	120	65	CO ₂	DCM	-	1:2	2:1	0,69	0,04
4.3	18	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,69	0,04
	u 19	120	65	CO ₂	DCM	-	2:1	2:1	0,69	0,04
4.3	u 20	120	65	CO ₂	DCM	-	1:1	2:1	0,69	0,04

* Não utilizado.

u Experimento realizado com o uso de ultrassom.

Ainda, visando evitar repetições desnecessárias sobre as condições experimentais empregadas, bem como complementar as informações apresentadas na Tabela 3.2, as seguintes considerações gerais foram elaboradas:

- i. As condições experimentais apresentados nas entradas de 1 a 6 da Tabela 3.2 foram utilizadas para os ensaios cinéticos de e-ROP de ϵ -caprolactona realizadas em PBR. Os ensaios experimentais realizados a partir das demais entradas (7 a 20) foram todos realizados em tempos espaciais fixos de 15 min. (seções 4.1 e 4.2);
- ii. As reações de e-ROP de ϵ -caprolactona foram todas realizadas em sistema contínuo (PBR) e meio pressurizado contendo (scCO₂) - dióxido de carbono supercrítico (seção 4.1) e/ou n-butano (seção 4.2) como solventes;
- iii. A lipase *Candida antarctica* fração B (Novozym 435) e a temperatura de 65 °C foram adotadas para todas as reações de e-ROP realizadas neste trabalho;
- iv. Para o estudo da produção de PCL sem o uso de cossolvente a enzima foi utilizada com um teor de 2,00 % de água (seção 3.1.1) e o monômero com um teor de 0,56 % de água para todos os experimentos realizados (Seção 4.1);
- v. A produção de PCL sem o uso de cossolvente foi realizada em pressões de 120 e 200 bar como pressões de trabalho (seção 4.1) e as amostras de PCL foram coletadas de 2 em 2 tempos espaciais (τ). Porém para os demais dados (produção de PCL com o uso de cossolvente) apenas a pressão de 120 bar foi empregada, bem como as amostras de PCL foram coletadas a cada intervalo de 1 tempo espacial (τ).

Cabe salientar que a escolha das condições de reação (temperatura e pressão) e razão mássica solvente/monômero (S/M), bem como a seleção do solvente e da enzima mais promissora para tais reações foi baseada nos poucos (porém de grande relevância) trabalhos disponíveis na literatura (ROSSO COMIM, et al., 2013; SANTOS et al., 2012; KUNDU et al., 2011; THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004) que contribuíram como ponto de partida para o presente estudo. A lipase Novozym 435 usada em temperaturas em torno de 65°C é adotada por consenso entre os trabalhos citados, como a mais promissora para e-ROP de ϵ -caprolactona, fato que motivou a seleção desta como o biocatalisador das reações e consequentemente da temperatura de

Capítulo 3: Material e Métodos

processo como a sua temperatura ótima de atividade. As condições de pressão foram baseadas no trabalho de Rosso Comim et al. (2013), que indicaram essa faixa como adequada para estudo, baseado num abrangente trabalho sobre o efeito dessa variável.

Visando obter massa suficiente de polímero para as análises de cromatografia de permeação em gel (GPC) e/ou outras possíveis análises (como DSC, RMN e etc.), o estudo da Produção de PCL realizada sem o uso de cossolvente foi realizada de forma a coletar a massa de produtos produzida a cada 2 tempos espaciais (τ), ou seja, coletas de amostras experimentais de 2 em 2 τ . No entanto, após a realização das análises de GPC, observou-se que a massa coletada a cada intervalo de 1 tempo espacial (τ) era suficiente. A partir disso as coletas de dados passaram a ser realizadas a cada intervalo de 1 (τ).

CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este capítulo apresenta os resultados obtidos para a produção de poli(ϵ -caprolactona) em sistema contínuo e meio pressurizado via catálise enzimática realizada pela lipase comercial Novozym 435.

Visando uma melhor apresentação dos resultados obtidos, bem como evitar repetições de considerações/informações em comum entre os sistemas estudados no presente trabalho, os mesmos foram divididos e serão apresentados neste capítulo em 3 principais seções assim denominadas:

- 4.1) Produção de PCL realizada sem o uso de cossolvente;
- 4.2) Produção de PCL realizada com o uso de cossolvente;
- 4.3) Produção de PCL realizada para longos períodos de tempo em condições otimizadas.

Com o objetivo de evitar uma apresentação muito extensa, ou considerações repetitivas sobre os sistemas avaliados, uma parte dos dados tabelados foi apresentada como apêndice. Desta forma, os resultados foram apresentados (nas seções a seguir) em sua maioria de forma gráfica.

4.1 PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA SEM O USO DE COSSOLVENTE

4.1.1 Efeito das variáveis de processo nas reações de e-ROP

Os estudos preliminares desta tese foram realizados objetivando a produção de PCL em modo contínuo sob pressões de 120 e 200 bar usando apenas o scCO_2 como solvente (sem uso de cossolvente) para as reações realizadas a 65 °C e com razões mássicas de solvente/monômero (S/M) de 2:1 (2 partes de CO_2 para 1 de ϵ -CL) e 1:2 (1 parte de CO_2 para 2 de ϵ -CL).

A Tabela 4.1 apresenta os resultados de rendimento das reações Y (%), de massa molecular (M_n) e (M_w) e de índice de polidispersão (PI) das reações de e-ROP de ϵ -CL obtidos na condição de 120 bar e razões mássicas (S/M) de 2:1 e 1:2 respectivamente. Já a Tabela 4.2 apresenta os resultados da e-ROP de ϵ -CL obtidos para a pressão de 200 bar, razão mássica (S/M) de 2:1 e 1:2 respectivamente.

Capítulo 4: Resultados e Discussão

Tabela 4.1 - Resultados de Y, M_n , M_w e IP para as reações de polimerização a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2 respectivamente.

tempo (min.)	CO ₂ /ε-CL = 2:1				tempo (min.)	CO ₂ /ε-CL = 1:2			
	^a Y (%)	M_n (Da)	M_w (Da)	IP		^a Y (%)	M_n (Da)	M_w (Da)	IP
10,7	60,1	21700	36800	1,7	17,8	50,9	29500	47500	1,6
8,6	55,2	20600	35000	1,7	8,9	34	21300	41100	1,5
4,3	45,3	14500	26700	1,8	5,9	23,9	15200	24500	1,6
2,9	35,7	10100	19900	2,0	4,4	20,1	10800	19500	1,8
2,1	24,8	9900	20200	2,0	3,6	17,6	8700	17500	2,0
1,7	17,6	9800	20300	2,1	3,0	12,2	8300	17500	2,1
1,4	12,2	9400	19900	2,1	-	-	-	-	-

^a Rendimento da reação (Y) = [(massa de PCL purificado)/(massa de ε-CL)] x100

Tabela 4.2 - Resultados de Y, M_n , M_w e PI para as reações de polimerização a 200 bar, 65 °C e razão mássica S/M de 2:1 e 1:2 respectivamente.

tempo (min.)	CO ₂ /ε-CL = 2:1				tempo (min.)	CO ₂ /ε-CL = 1:2			
	^a Y (%)	M_n (Da)	M_w (Da)	IP		^a Y (%)	M_n (Da)	M_w (Da)	IP
17,9	53,5	35800	53700	1,5	31,25	48,5	25100	37100	1,5
8,9	48,7	24100	38800	1,6	25,0	42,1	20800	31500	1,6
4,5	37,5	20300	30450	1,6	12,5	27,4	17000	23100	1,7
3,0	25,7	16700	26720	1,7	6,3	15,5	13600	22800	1,7
2,2	16,2	13500	21600	1,8	4,2	14,2	11900	21400	1,8
1,8	15,6	12800	21760	1,9	3,1	13,1	10300	19200	1,9
1,5	13,7	10200	17340	2,0	-	-	-	-	-

^a Rendimento da reação (Y) = [(massa de PCL purificado)/(massa de ε-CL)] x100.

Os maiores rendimentos de reação (Y %) obtidos para as e-ROPs realizadas a 120 bar foram de 60,1 % para razões S/M = 2:1 e 50,9 % para razões S/M = 1:2 (Tabela 4.1). Para os experimentos realizados a 200 bar os maiores valores de Y foram de 53,5 % para razões S/M = 2:1 e 48,5 % para razões S/M = 1:2 (Tabela 4.2). Estes resultados de rendimento correspondem ainda às maiores massas moleculares numéricas (M_n) obtidas, a saber, 21700, 29500, 35800 e 25100 Da,

respectivamente. Estes resultados foram obtidos para os maiores tempos espaciais (τ) estudados sob tais condições de reação (T, P e razões mássicas $\text{CO}_2/\varepsilon\text{-CL}$). Os menores valores de IP também são observados, porém, de forma menos acentuada para os maiores tempos espaciais (τ).

Observa-se nestes sistemas que, quanto maior o tempo de permanência dos reagentes dentro do reator PBR (Tabelas 4.1 e 4.2), melhores são as reações em termos de $Y(\%)$, M_n e M_w e IP, obtendo-se assim, produtos (PCL) de melhor qualidade. Estes resultados são coerentes com aqueles observados por outros pesquisadores para e-ROP de $\varepsilon\text{-CL}$ em reator PBR (ZHANG et al., 2012; KUNDU et al., 2011). No entanto, quanto maiores os valores de τ , maiores são as perdas de carga (diminuição de pressão) ao longo do PBR chegando a valores percentuais de perda de carga de 29,2 e 17,6 % (~35 bar) para os experimentos realizados a 120 e 200 bar respectivamente. Esta perda de carga ocorre (provavelmente) devido ao aumento na viscosidade do sistema (como resultado do crescimento das cadeias poliméricas) levando a uma diminuição na transferência de massa (GUMEL et al., 2013; GUMEL et al., 2012a; GEUS, 2007; BROOKS, 1981) que, por conseguinte, pode levar ao entupimento do reator durante as reações.

Neste contexto, observou-se experimentalmente que tempos espaciais maiores que 10,7 e 17,8 min. (Tabela 4.1) para experimentos realizados a 120 bar e razões S:M de 2:1 e 1:2 respectivamente, acabaram por ocasionar entupimentos no sistema e perda dos ensaios experimentais. Para os experimentos realizados a 200 bar, os tempos limites de reação sem ocorrer entupimentos no PBR foram de 17,9 min. (razão S/M =2:1) e 31,25 min. (razão S/M =1:2). Desta forma podemos afirmar que, o aumento da resistência à transferência de massa em decorrência da elevação da viscosidade do meio (à medida que as cadeias poliméricas propagam-se) ao longo do PBR é um aspecto extremamente importante para a análise e otimização do sistema em questão.

Além disso, um fluxo interrompido na saída do reator (fluxo pulsante) principalmente para as reações com maior conversão monomérica foi observado. Este padrão de escoamento pode ter sido ocasionado devido ao gradiente de pressão observado ao longo do reator, bem como em função de possível precipitação do polímero, o que acabou fazendo com que a mistura reacional jorrasse com maior intensidade em dados instantes, provocando assim variações na velocidade do escoamento e dificuldades em se atingir um estado estacionário (MORAIS et al., 2012).

Visando facilitar a análise dos efeitos causados pela diferença de pressão e razão mássica solvente/monômero (S/M) nas características e propriedades do produto final (policaprolactona - PCL), os resultados cinéticos (Y %) para a síntese de PCL apresentados nas tabelas 4.1 e 4.2 para reações em PBR são apresentados graficamente na Figura 4.1; Enquanto os resultados em termos de massa molecular numérica média (M_n) e massa molecular ponderal média (M_w) podem ser observados nas Figuras 4.2 e 4.3 respectivamente para as mesmas condições reacionais.

Figura 4.1 - Resultados de rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 e 200 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.

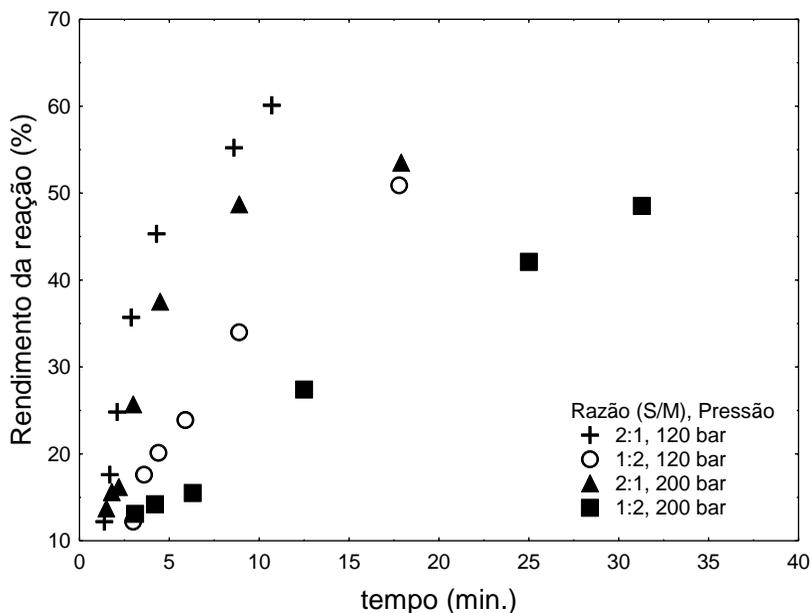
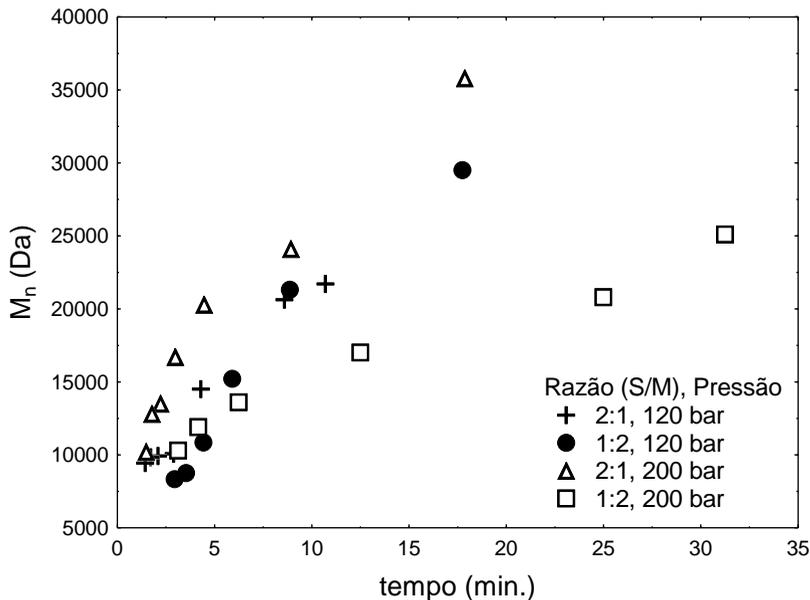


Figura 4.2 - Resultados cinéticos da massa molecular numérica média (M_n) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 e 200 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.

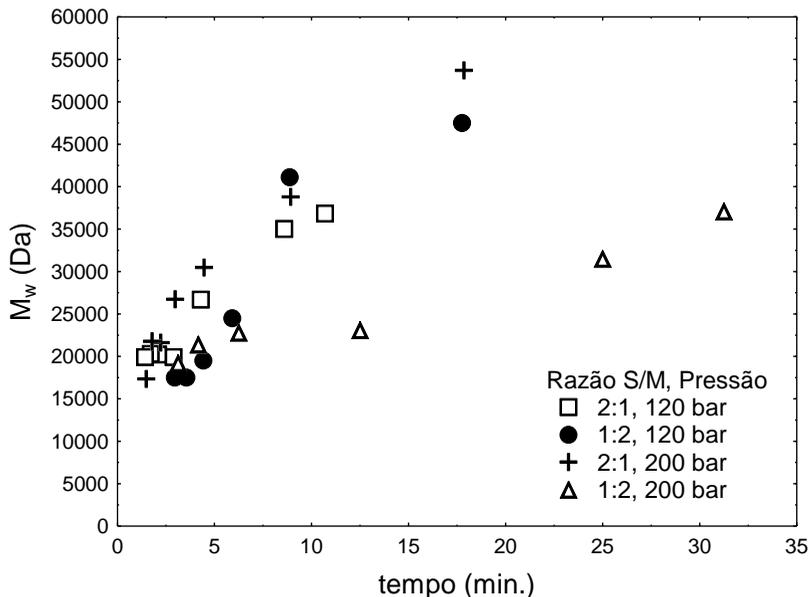


Nota-se nestas figuras (Figuras 4.1, 4.2 e 4.3) que a utilização de razões mássicas (S/M) de 2:1 promove de forma geral um aumento significativo na velocidade de reação das polimerizações em modo contínuo, resultando em maiores valores de Y (%) em menor tempo de reação para ambas as pressões avaliadas. Este comportamento também é observado, mas de forma menos acentuada, para valores de M_n e M_w .

Avaliando-se as Figura 4.2 e 4.3 (M_n e M_w) juntas observa-se que não há diferença nos valores de M_w obtidos sob diferentes condições de pressão (120 e 200 bar) para razão S/M fixa em (2:1). Porém observa-se um modesto aumento nos valores de M_n para as reações realizadas a 200 bar e mesma razão S/M (2:1).

Figura 4.3 - Resultados cinéticos da massa molecular numérica média (M_n) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 e 200 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.



Sabe-se que a M_n é fortemente influenciada pelo número de cadeias poliméricas, enquanto que para M_w , a massa molecular das cadeias poliméricas presentes em cada fração é o fator mais importante (CANAVEROLO, 2007). Portanto, quanto maior o número de cadeias poliméricas (com diferentes massas moleculares) no produto final, menores os valores de M_n (ver seção 2.1.1).

Além disso, tem-se observado na literatura (THURECHT et al., 2006; GEUS et al., 2005; CORDOVA et al., 1998) por análises de GPC e ^1H RMN que a presença de produtos cíclicos (polímeros e/ou oligômeros cíclicos) aumenta quantitativamente com a diminuição do teor de monômero no meio reacional (causado pelo aumento da conversão monomérica) devido à maior probabilidade de transesterificação intra e intermolecular levando, por conseguinte, a menores valores de M_n .

Logo, a explicação para os menores valores de M_n obtidos para os experimentos realizados a pressão de 120 bar e razão S/M de 2:1 em relação aos experimentos realizados a 200 bar, sob mesma condição de

razão S/M (2:1), podem ser causados por uma maior quantidade de polímeros e/ou oligômeros cíclicos ou de baixa massa molecular presentes no produto final (policaprolactona) e não devido ao efeito de maior pressão/densidade do CO₂ no meio reacional. Isto porque, para os experimentos realizados a pressão de 120 bar e razão S/M de 2:1 foram obtidos os maiores valores de conversão monomérica (Y %) em menor tempo.

Pesquisas anteriores (ROSSO COMIM et al., 2013; THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004) para e-ROP de ϵ -CL em reator batelada usando CO₂ como solvente, realizadas em uma faixa de 80 a 280 bar de pressão, também têm apontado para uma região ótima de pressões em torno de 100 bar (de 80 a 120 bar).

Quanto ao índice de polidispersão (IP) das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em PBR (Figura 4.4) observa-se de forma geral que maiores tempos espaciais (τ) geram menores valores de IP para todas as condições de pressão (120 e 200 bar) e razão S/M (2:1 e 1:2) avaliadas. Esta tendência é facilmente observada na Figura (4.5) que apresenta os cromatogramas de GPC para as reações de polimerização em modo contínuo a 200 bar, 65 °C, razão S/M de 2:1 e tempos espaciais (τ) de 17,9 min. (A) e 1,5 min. (B). Nesta figura observa-se claramente uma maior distribuição de massa molecular para o cromatograma B (amostragem com menor tempo espacial), o que reflete diretamente nos valores de IP obtidos. Os valores numéricos de IP para estes cromatogramas (Tabela 4.2) foram de 1,5 para o cromatograma A (17,9 min.) e 2,0 para o cromatograma B (1,5 min.).

No entanto, o pobre controle das reações de e-ROP sobre a cinética de polimerização catalisada pela lipase Novozym 435 com scCO₂ ou outro solvente convencional (por exemplo o tolueno) acarreta altos níveis de polidispersão do polímero obtido (THURECHT et al., 2006). Esta tendência é ainda mais acentuada para sistemas com elevada conversão, quando a concentração de monômero no sistema é baixa (THURECHT et al., 2006) ou para sistemas mais diluídos em solvente (SIVALINGAM e MADRAS, 2004).

Neste contexto, observa-se que as reações realizadas a 120 bar, as quais obtiveram maiores valores de conversão monomérica (Y %), apresentam também maiores valores de IP. Uma comparação em termos de diferentes razões S/M (2:1 e 1:2) e pressão de 120 bar demonstram ainda (Figura 4.4) um menor controle da reação (maiores valores de IP) para o sistema mais diluído (razão S/M de 2:1).

Figura 4.4 - Resultados de índice de polidispersão (IP) das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 e 200 bar para razões S/M de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.

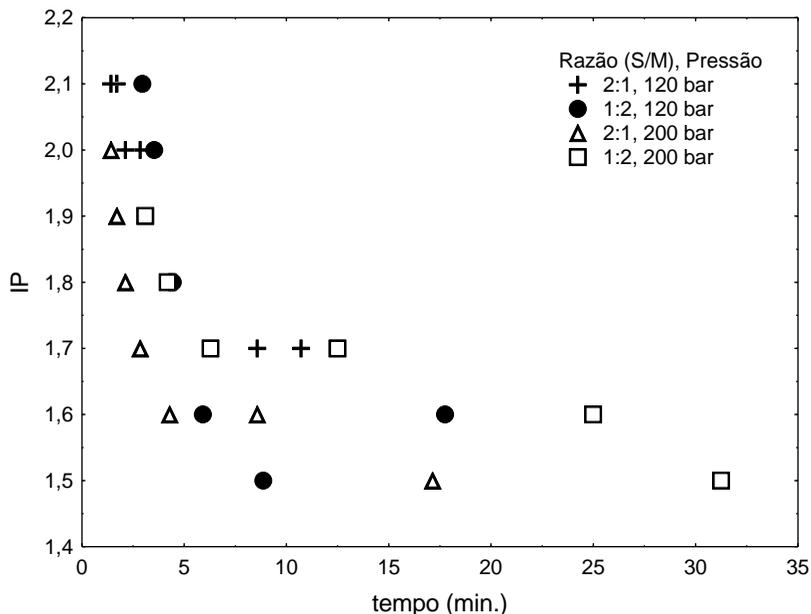
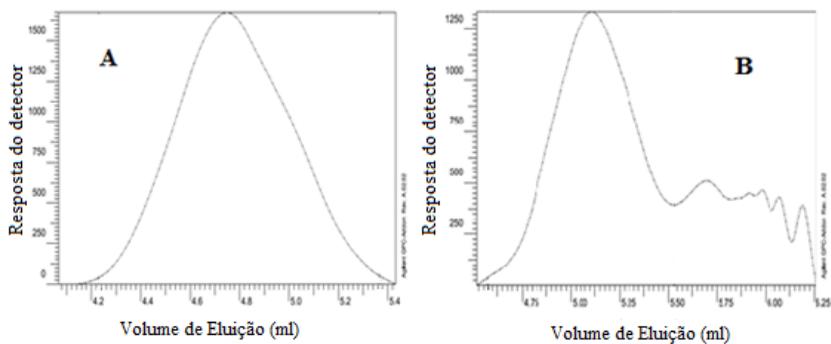


Figura 4.5 - Cromatogramas de GPC para e-ROP de ϵ -CL a 200 bar, para razões S/M de 2:1 e tempos espaciais de 17,9 min. (A) e 1,5 min. (B).

Fonte: O autor.



Tal comportamento (das amostras) apresentado nos cromatogramas de GPC do presente estudo foi também observado por Kundu et al. (2011) para e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo, porém usando tolueno como solvente e por Geus et al. (2005) e Bankova et al. (2002), para reações de e-ROP de ϵ -CL em modo batelada e com tolueno como solvente. De acordo com os trabalhos publicados pelos autores mencionados essa cauda polimérica apresentada após o pico cromatográfico pelo cromatograma B (do presente estudo) é constituída por produtos oligoméricos lineares e cíclicos. O desaparecimento desta cauda polimérica e, por conseguinte a diminuição dos valores de IP com o passar do tempo, pode ser devido à propagação dos produtos oligoméricos.

De acordo com Turecht et al. (2006) reações controladas são caracterizadas tipicamente por índices de polidispersão menores do que 1,5, devendo estes valores permanecer constantes (abaixo de 1,5) durante toda a faixa de rendimento. Desta forma os valores de IP obtidos no presente trabalho (1,5 a 2,1) indicam uma reação não controlada.

Contudo, é consenso entre os pesquisadores da área de e-ROP que o IP é fortemente influenciado pela quantidade de água presente no sistema. Quantidades de água acima daquela necessária para manter a atividade enzimática causam reações secundárias como formação de polímeros cíclicos, bem como reações de hidrólise das ligações éster alifáticas das cadeias poliméricas, o que pode ampliar a distribuição de massa molecular dos polímeros obtidos (ROSSO COMIM et al., 2013; SANTOS et al., 2012; MATSUMURA et al., 2006, TURECHT et al., 2006; GEUS et al., 2005). Como mencionado anteriormente (Item 3.2.4), tanto o monômero (0,8 % de água) quanto a enzima (2,0 % de água) utilizada para os experimentos de polimerização desta seção (Seção 4.1) continham grandes quantidades de água. Logo, menores valores de IP devem ser esperados (para as mesmas reações mencionadas) quando tratamentos prévios de secagem dos reagentes e do biocatalisador forem utilizados.

Devido à carência de estudos publicados até o presente momento para e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo e meio pressurizado, as Figuras 4.6 e 4.7 comparam os resultados do presente trabalho (reações em modo contínuo) com os resultados obtidos para reações em batelada (ROSSO COMIM et al., 2013) realizadas nas mesmas condições de reação (P , T , e razões mássicas S/M).

Figura 4.6 - Comparação entre resultados de rendimento obtidos para PBR e Batelada realizados a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2, sendo: Bat. (Batelada) e [E] (enzima).

Fonte: O autor.

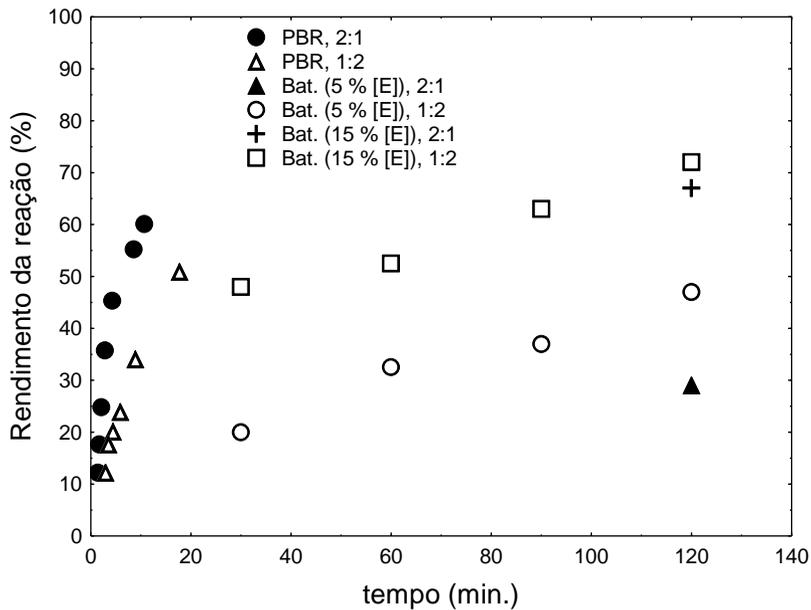
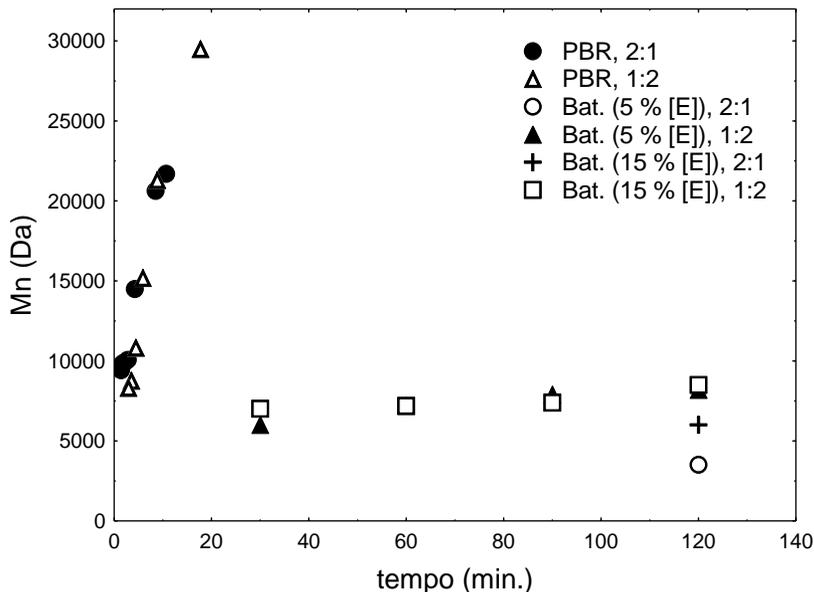


Figura 4.7 - Comparação entre resultados de M_n obtidos para PBR e Batelada realizados a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/M de 2:1 e 1:2, sendo: Bat. (Batelada) e [E] (enzima).

Fonte: O autor.



De maneira geral observa-se que as taxas iniciais das reações de polimerização para as variáveis Y e M_n são expressivamente maiores para o sistema contínuo em relação ao sistema em batelada. Estes resultados são coerentes com os resultados observados na literatura especializada (KUNDU et al., 2011). De acordo com Kundu et al. (2011), geralmente as velocidades iniciais de reação dependem principalmente de dois fatores, quantidade e tipo de catalisador (enzima) e taxa de transferência de massa. Neste caso, um melhor desempenho do reator contínuo em relação ao reator em batelada pode ser atribuído a dois principais fatores: i) em um reator PBR os reagentes são forçados a estar em contato constante com os sítios ativos das enzimas, isto é, a distância a ser percorrida pelo monômero até as enzimas é muito menor em um PBR; e ii) como a razão massa de enzimas/massa de substrato no PBR é muito maior do que no reator batelada, mais sítios ativos enzimáticos estão disponíveis para os monômeros a todo instante.

Neste contexto, uma melhora no desempenho dos reatores batelada também é observada pelo aumento da razão de massa de enzimas/massa de substrato no meio reacional (ROSSO COMIM et al., 2013; LOEKER et al., 2004), no entanto, aumentos expressivos na razão mássica de enzimas imobilizadas em relação ao substrato podem ser impraticáveis em alguns casos devido a dificuldades de mistura em grandes conteúdos sólidos, bem como a quebra do suporte enzimático e consequente perda das enzimas pelo estresse mecânico.

Sivalingam e Madras (2004) demonstraram que a lipase Novozym 435 realiza reações de polimerização e de degradação (degradação por cisão de cadeias finais específicas) simultaneamente em e-ROP de ϵ -CL para reações realizadas em sistemas de batelada. De posse de tal informação, Kundu, et al. (2011) afirmam que o melhor desempenho demonstrado pelo reator PBR em relação ao batelada pode ser ainda devido às taxas de polimerização serem sensivelmente maiores do que às de degradação (em e-ROP) para sistemas contínuos em relação aos sistemas em batelada. De acordo com Sivalingam e Madras (2004) as taxas de polimerização e de degradação são diretamente dependentes da quantidade e tipo de catalisador (enzima), da temperatura usada, bem como do tipo e concentração de solvente usado na reação (SIVALINGAM; MADRAS, 2004). Desta forma o melhor desempenho apresentado no presente trabalho do reator PBR frente ao batelada (maiores taxas de polimerização em relação à degradação) pode ser devido à maior razão enzima/substrato do PBR em relação ao batelada.

Entretanto, resultados similares (desempenho melhor do PBR em relação ao batelada) foram apresentados (ver seção 2.5, Figura 2.11) por Kundu, et al. (2011) para reações de e-ROP de ϵ -CL em PBR contra reações em batelada sob mesmas condições de reação (P , T , e razões S/M), bem como de razão mássica entre enzima e substrato. Porém esta comparação foi realizada para reações de e-ROP de ϵ -CL em pressões atmosféricas e com tolueno como solvente.

4.1.1.1 Morfologia dos polímeros obtidos

No que tange à morfologia, os polímeros obtidos pela e-ROP de ϵ -caprolactona apresentaram alterações no aspecto físico (mudanças na opacidade e resistência dos polímeros) com o aumento da massa molecular em consequência do incremento no tempo espacial (τ) do substrato dentro do PBR. A mudança na opacidade pode ser observada na Figura 4.8 que apresenta imagens das amostras de PCL obtidas pelas reações de polimerização a 200 bar, 65 ° C e razão S/M de 2:1. Este efeito causado pelos diferentes τ pode ser observado comparando imagens da Figura 4.8 em ordem crescente de τ , com tempos espaciais variando de 1,49 min até 17,86 min, nas fotos A, B, C, D, E, F e G. Os valores de M_n para os polímeros obtidos e observados (Figura 4.8) de A a G são dados respectivamente pelos seguintes valores, 10200 Da, 12800 Da, 13500 Da, 16700 Da, 20300 Da, 24100 Da e 35800 Da.

Observou-se que o aumento no τ para reações realizadas nas mesmas condições de P , T e razão S/M resultou não só no aumento de M_n , mas também em um incremento gradativo e da opacidade (Figura 4.8) dos polímeros obtidos. Cabe ressaltar que esse comportamento também foi observado para as reações realizadas a 120 bar e razão S/M de 2:1 e de 1:2. Rosso Comim (2013) também observou este comportamento para e-ROP de ϵ -CL sob mesmas condições de reação (T , P e razão S/M), porém em reator batelada. Ainda, de acordo com Callister (2002) os polímeros amorfos são maleáveis e quase transparentes. Já os polímeros cristalinos devido às fortes interações intermoleculares, são mais duros e resistentes (porém quebradiços); como as regiões cristalinas espalham a luz, estes polímeros são mais opacos (CALLISTER, 2002). Observando a Figura 4.8, por este ponto de vista, podemos inferir visualmente que a região amorfa dos polímeros diminui gradativamente com o aumento do tempo de residência do substrato dentro do PBR. Porém o grau de cristalinidade só pode ser obtido pelo uso de técnicas experimentais adequadas, como por exemplo, o DSC (Calorimetria Exploratória de varredura Diferencial).

Figura 4.8 - Amostras de policaprolactona obtidas a 65°C, razão S/M de 2:1 e pressão de 200 bar para os seguintes tempos espaciais: A) 1,49 min., B) 1,79 min., C) 2,23 min., D) 2,98 min., E) 4,47 min., F) 8,93 min. e G) 17,86 min.

Fonte: O autor.



4.1.1.2 Produção de PCL em PBR para períodos prolongados

A reutilização da enzima e a vida útil prolongada são dois parâmetros importantes que determinam a viabilidade econômica de enzimas em aplicações comerciais (KUNDU et al., 2011). O reator PBR desenvolvido neste estudo permite estudar a variação da atividade enzimática para a síntese em fluxo contínuo durante um período prolongado ou para grandes quantidades de reagentes processados. Neste contexto, para determinar a retenção da atividade enzimática com o passar do tempo de uso da mesma carga de enzimas, através dos valores de Y e M_n para os polímeros obtidos durante um tempo prolongado de reação, as amostras foram coletadas de 2 em 2 tempos espaciais (τ) para 6 ensaios (seis coletas de 2 τ , totalizando 12 τ de reação) utilizando a mesma carga de enzimas. Cabe salientar-se que os ensaios foram realizados sem interrupções das reações, sem nenhum tratamento enzimático entre as coletas e usando a mesma carga de enzimas (ver seção 3.2.1.2).

Desta forma, as Tabelas B.1 e B.2, bem como as Figuras 4.9 e 4.10 apresentam respectivamente os resultados de rendimento da reação (Y) após períodos prolongados de uso das enzimas nas reações de polimerização a 120 bar, 65 °C e razões S/M de 2:1 e 1:2. Enquanto os resultados de Y para as reações de polimerização a 200 bar, 65 °C e razões S/M de 2:1 e 1:2 são apresentadas pelas Tabelas B.3 e B.4 e Figuras 4.11 e 4.12 respectivamente. Cabe salientar que, cada ponto experimental apresentado nas curvas evidenciadas por estas figuras (Figuras 4.9, 4.10, 4.11 e 4.12) demonstra o valor médio de (Y) após 2 τ . Ou seja, para o caso de $\tau = 10,7$ min. o primeiro ponto apresentado na curva experimental (Δ) é dado em 21,4 min. (2 $\tau = 21,4$ min.), o segundo é dado em 42,8 min. (4 $\tau = 42,8$ min.), o terceiro em 64,2 min. (6 $\tau = 64,2$ min.) e assim sucessivamente.

Figura 4.9 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

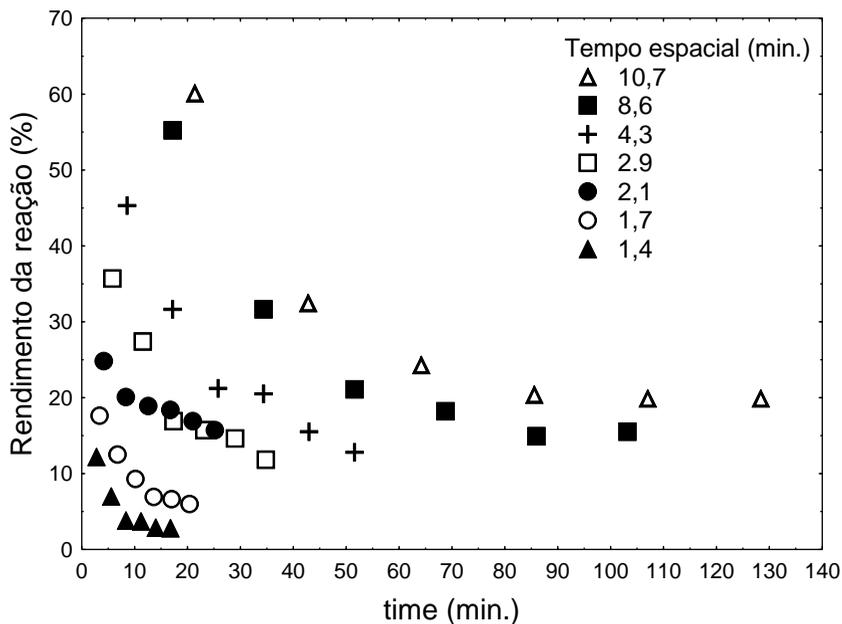


Figura 4.10 - Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

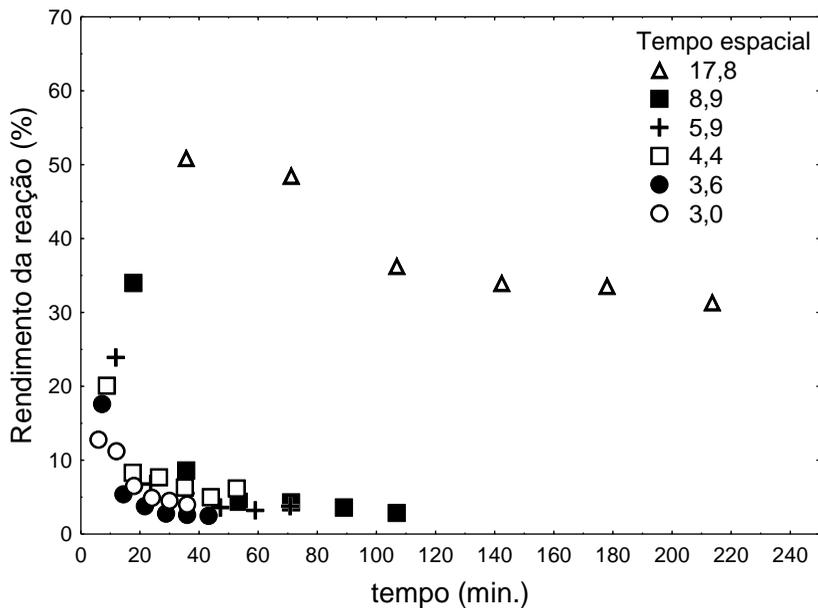


Figura 4.11 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

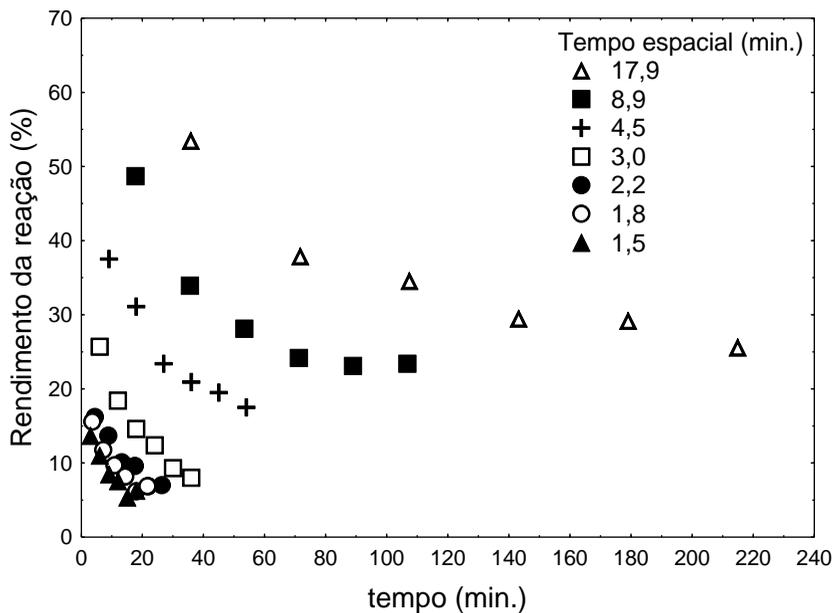
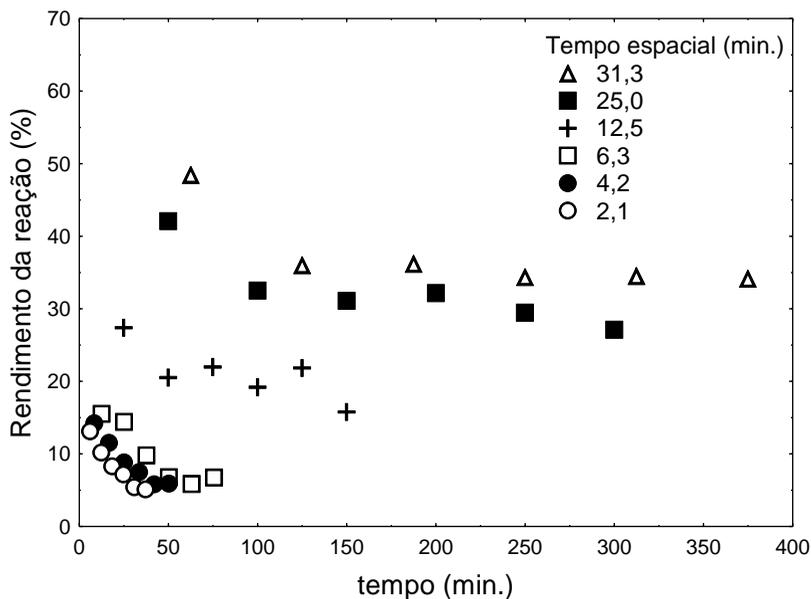


Figura 4.12 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

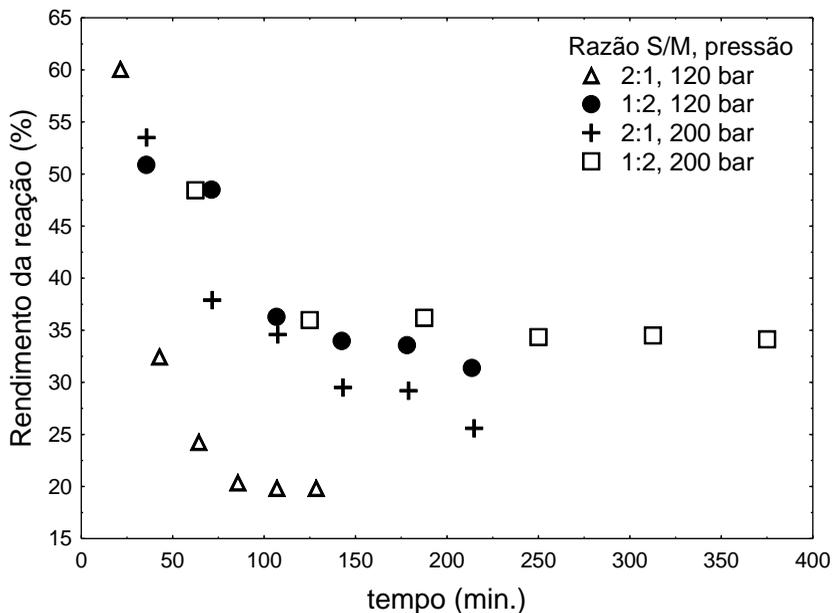


Observa-se nestas figuras (4.9, 4.10, 4.11 e 4.12) que a conversão monomérica diminuiu significativamente com o processamento contínuo dos reagentes e, esta redução nos valores do rendimento da reação (Y) foi observada para todas as condições experimentais testadas.

No que tange o tempo espacial (τ) observa-se que, as reações realizadas em maior τ demonstraram uma menor diminuição nos valores de Y com o passar do tempo de reação. Neste contexto, os melhores resultados de Y obtidos para as quatro condições testadas (120 e 200 bar para razões S/M 2:1 e 1:2) foram plotados na Figura 4.13 para uma melhor avaliação dos efeitos de pressão e razão mássica S/M sob os rendimentos de reação com o passar do tempo de uso da enzima. As condições elencadas como melhores para esses sistemas foram aquelas onde se obtiveram os maiores valores de rendimento das reações.

Figura 4.13 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 e 200 bar para razões S/M de 2:1 e 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima. Tempos espaciais (τ) foram de: (Δ) 10,7 min., (\bullet) 17,8 min., (+) 17,9 min. e (\square) 31,3 min.

Fonte: O autor.



Observa-se na Figura 4.13 que, sob razões mássicas (S/M) de 1:2 a redução nos valores do rendimento da reação (Y) é menor para ambas as pressões avaliadas. Porém a pressão demonstrou pouca influência nas reações para a faixa de pressão avaliada (120 e 200 bar). A maior redução nos valores de Y com o uso contínuo da mesma carga de enzimas foram observados para os experimentos realizados a 120 bar e razão S/M de 2:1.

Quanto aos resultados de massa molecular numérica média (M_n) após períodos prolongados de uso das enzimas nas reações de polimerização a 120 bar, 65 °C e razões S/M de 2:1 e 1:2 são apresentadas respectivamente pelas Tabelas B5 e B6, bem como pelas Figuras 4.14 e 4.15. Enquanto os resultados de M_n para as reações de polimerização a 200 bar, 65 °C e razões S/M de 2:1 e 1:2 são

apresentadas pelas Tabelas B.7 e B.8 e Figuras 4.16 e 4.17 respectivamente.

Cabe salientar que, cada ponto experimental apresentado nas curvas evidenciadas por estas figuras (Figuras 4.14, 4.15, 4.16 e 4.17) demonstra o valor médio de (M_n) após 2τ . Ou seja, para o caso de $\tau = 10,7$ min. o primeiro ponto apresentado na curva experimental (Δ) é dado em 21,4 min. ($2\tau = 21,4$ min.), o segundo é dado em 42,8 min. ($4\tau = 42,8$ min.), o terceiro em 64,2 min. ($6\tau = 64,2$ min.) e assim sucessivamente.

Figura 4.14 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 120 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.
Fonte: O autor.

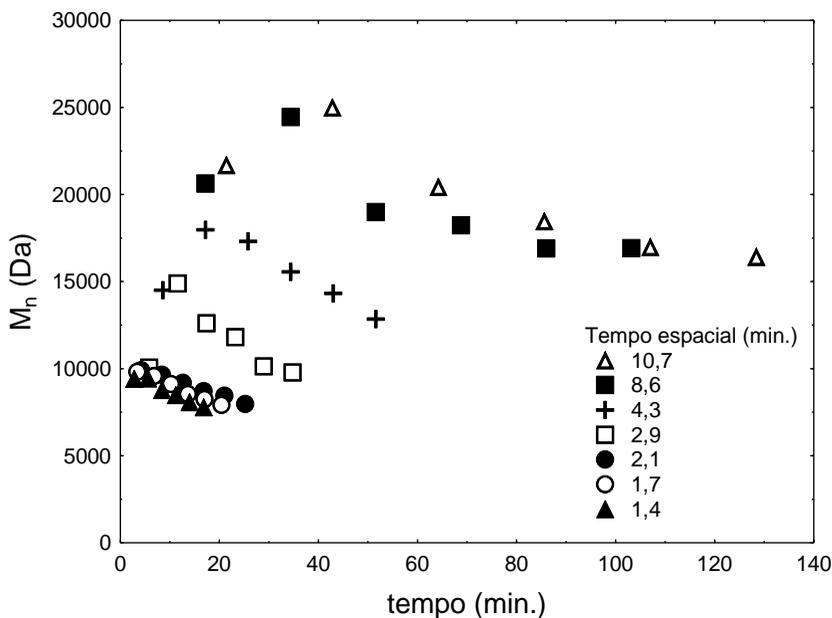


Figura 4.15 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 120 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

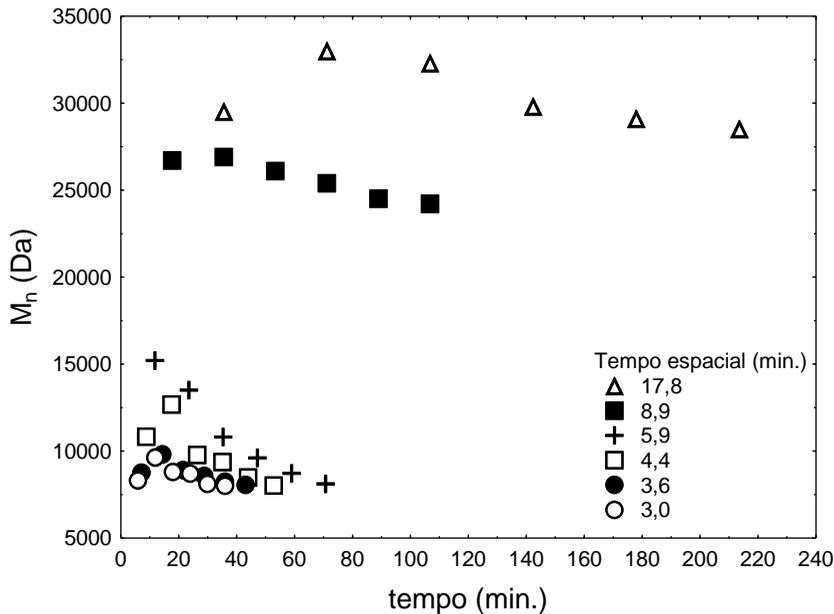


Figura 4.16 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 200 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

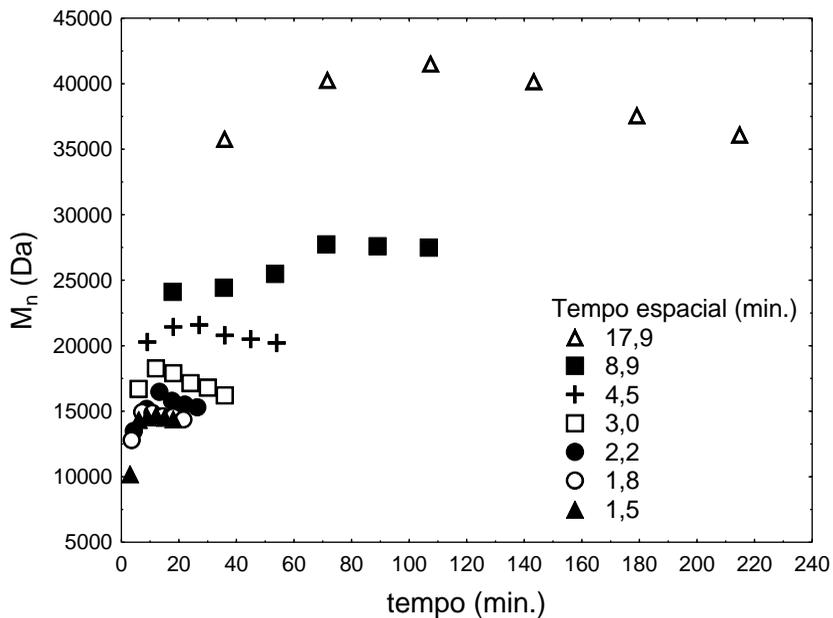
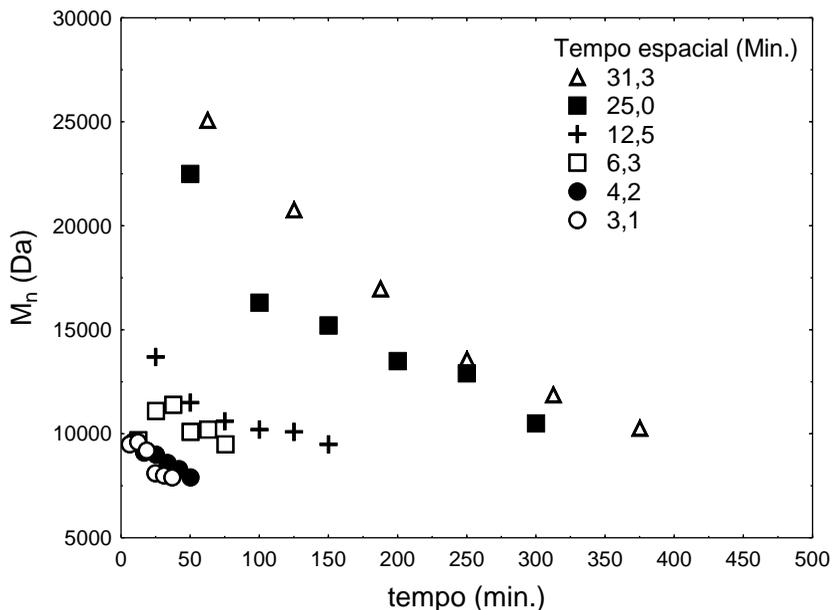


Figura 4.17 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 200 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

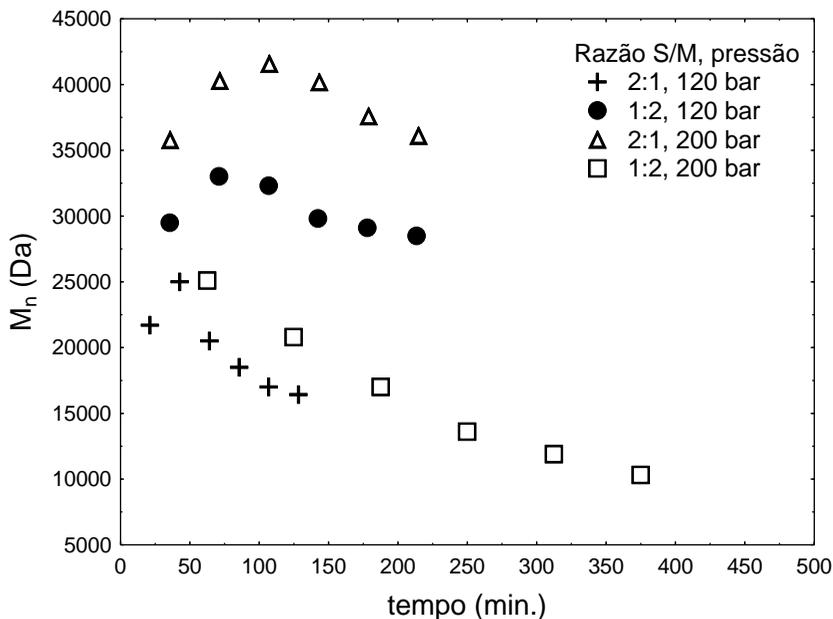


Exceto pelos dados experimentais apresentados pela Tabela B8 e Figura 4.17 (200 bar e razão S/M de 1:2), os demais resultados tabelados (Tabelas B5, B6 e B7) e gráficos (Figuras 4.14, 4.15 e 4.16) demonstram pouca variação nos valores de M_n para tempos prolongados de uso da enzima (principalmente para os maiores tempos espaciais). Observa-se nessas figuras que os experimentos realizados a razão S/M de 2:1 (Figuras 4.14 e 4.16) sofrem menores reduções nos valores de M_n para ambas as pressões avaliadas.

Para melhor avaliação dos efeitos de pressão e razão mássica S/M nos valores de M_n com tempos prolongados de uso das enzimas, os melhores resultados de M_n obtidos para as quatro condições reacionais testadas (120 e 200 bar para razões S/M 2:1 e 1:2) foram plotados na Figura 4.18. As condições elencadas como melhores para esses sistemas foram aquelas onde se obtiveram os maiores valores de M_n (região de maior interesse).

Figura 4.18 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ CL a 200 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima. Tempos espaciais (τ) foram de: (+) 10,7 min., (●) 17,8 min., (Δ) 17,9 min. e (\square) 31,3 min.

Fonte: O autor.



Na Figura 4.18 os experimentos realizados sob razões mássicas (S/M) de 2:1 merecem maior atenção, pois, mesmo após 12 tempos espaciais de processamento de reagentes, os valores de M_n permanecem constantes (200 bar e Razão S/M 2:1) ou com pequena redução (120 bar razão S/M de 2:1). Já para os experimentos realizados a razão S/M de 1:2 observa-se que os valores de M_n permanecem constantes a 120 bar, porém a 200 bar os valores de M_n diminuem rápida e expressivamente.

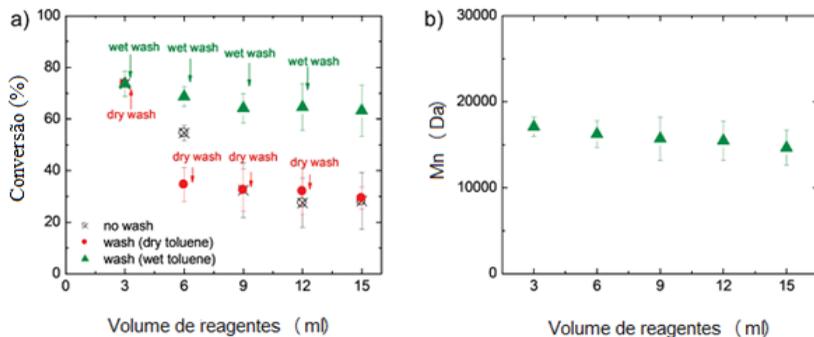
Além disso, foram observados aumentos/oscilações nos valores de M_n para as primeiras amostras de cada condição reacional. Essas variações podem ocorrer devido a flutuações do fluxo de produto até que se atinja o estado estacionário no PBR.

A tendência apresentada neste trabalho para os valores de Y e M_n em função de vários tempos de residência (τ) ou volume de reagentes processado, também foi observada por Kundu et al. (2011), porém

usando um micro-reator contínuo a pressão atmosférica e com tolueno como solvente (Figura 4.19). Cabe salientar que o máximo volume de reagentes (tolueno + ϵ -CL para razões S/M de 2:1) processados por tais autores (para uma mesma carga de enzimas) foi de 15 mL, fato esse que inviabilizou a comparação gráfica com os resultados obtidos no presente trabalho. No entanto esses autores verificaram que a diminuição do valor de Y de 72 % (com 3 mL de substrato processado) para 30 % (após 15 mL de substrato processado) foi ocasionada pela falta de água necessária para conferir estabilidade estrutural a enzima (todos os reagentes sofreram extensivos processos de secagem antes das reações).

Figura 4.19 – Valores de conversão monomérica (a) e M_n (b) como função do volume de reagentes processados pela mesma carga de enzimas.

Fonte: O autor.



Cabe salientar que Kundu et al. (2011) melhoraram os valores M_n , bem como os valores de conversão de 30 % para 62 % (após 15 mL de substrato processado) após o procedimento de lavagem das enzimas (a cada 3 mL de substrato processados) por tolueno não analítico (Figura 4.19).

No entanto, a quantidade de água presente nas reações de e-ROP de ϵ -CL do presente trabalho são expressivamente maiores do que àquelas apresentadas no trabalho de Kundu et al. (2011). Neste contexto, a explicação para tais diminuições da atividade enzimática e, por conseguinte, dos valores de Y e M_n , pode estar relacionada com a adsorção e/ou o acúmulo de PCL sobre as enzimas. Esta hipótese nos conduz a uma diminuição gradativa da área superficial do biocatalisador

e, por conseguinte, dos sítios enzimáticos ativos participando das reações.

De modo a avaliar o motivo para a diminuição da atividade enzimática que resultou em reduções nos valores de Y e M_n com o uso contínuo da mesma carga de enzimas, amostras de enzimas foram coletadas após a realização dos experimentos para determinação da atividade enzimática de acordo com a metodologia descrita em Oliveira et al. (2006); Fiametti (2008) e Krüger (2010). Para este fim, as amostras de enzima foram lavadas com tetraidrofurano (THF) e, em seguida, submetidas ao teste da atividade enzimática.

Observou-se que, após esta etapa a enzima manteve 97,0 % e 96,5 % da sua atividade inicial para experimentos realizados a razão S/M de 2:1 e pressão de 120 e de 200 bar, respectivamente. Além disso, pequenas quantidades de polímero foram observadas após a precipitação das misturas (THF+polímero) resultantes das lavagens das enzimas em etanol gelado (como anti-solvente – ver seção 3.2.1). Logo, a diminuição dos valores de Y e de M_n (com o processamento contínuo dos reagentes pela mesma carga de enzimas) evidenciadas nessa seção (4.1.1.2) pode ser devida ao acúmulo de material (polímero e/ou monômero) sobre o suporte polimérico das enzimas e não à diminuição da atividade enzimática.

Este problema de acúmulo de material sobre as enzimas pode ser sanado por lavagens graduais das enzimas com solvente para a retirada do material polimérico adsorvido ou acumulado sobre as enzimas (KUNDU et al., 2011) ou a utilização de algum cossolvente nas reações, o que facilitaria a transferência de massa no PBR, diminuindo a viscosidade do sistema e a adsorção ou acúmulo de material polimérico sobre as enzimas.

4.1.2 Considerações sobre as reações sem o uso de cossolvente

Um dos fatores de maior interesse em estudos realizados em sistema contínuo advém da possibilidade e ou necessidade de produção de produtos finais com características similares ou melhores que aquelas obtidas em batelada, porém em maior escala e em menor tempo. Quando trata-se pontualmente da produção de polímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis como a policaprolactona para aplicações biomédicas, a obtenção de maiores massas moleculares e rendimentos de reação em menor tempo são de extrema importância.

Desta forma, visando contextualizar as melhores condições experimentais observadas no decorrer da seção 4.1 para a produção de PCL em modo contínuo e sem o uso de co-solvente, observou-se que:

- I. Como esperado, o uso de maiores tempos espaciais resultam em maiores valores de rendimento das reações (Y), bem como maiores valores de massa molecular (M_n e M_w);
- II. Maiores valores de Y e de M_n são obtidos em menor tempo, com o uso de razões S/M de 2:1 em qualquer das pressões avaliadas (120 e 200bar);
- III. Altos valores de índice de polidispersão (valores de IP acima de 1,5) foram observados para os polímeros obtidos para todas as condições experimentais avaliadas;
- IV. No que tange a produção de PCL para longos tempos de reação com a mesma carga de enzimas observou-se que os valores de Y diminuem expressivamente com o processamento contínuo de reagentes. Essa diminuição na conversão monomérica pode ser devido ao acúmulo ou adsorção de material sobre as enzimas imobilizadas;
- V. Menores reduções nos valores de Y com o processamento contínuo de reagentes por uma mesma carga de enzimas foram obtidos para as reações realizadas sob razões S/M de 1:2, porém menores reduções nos valores de M_n são obtidos para razões S/M de 2:1 para qualquer das pressões avaliadas (120 e 200 bar).

4.2 PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA COM O USO DE COSSOLVENTE

O ponto de partida para a escolha das condições experimentais adotadas nesta seção foram os dados experimentais obtidos na seção 4.1, onde, as melhores condições experimentais observadas são sumarizadas na seção 4.1.2. Cabe salientar que diversas variáveis (ver início da seção 4) foram testadas a fim de aumentar a eficiência na produção de PCL em sistema contínuo e os resultados são apresentados no decorrer desta seção (4.2).

Neste contexto, considerando que a diminuição no nível da pressão de 200 para 120 bar não demonstrou afetar significativamente as reações de e-ROP de ϵ -CL, optou-se por trabalhar com a condição de pressão fixa em 120 bar visando a redução de gasto energético para a

operação do sistema (ROSSO COMIM et al., 2013). Quanto à definição da melhor quantidade de solvente no sistema observou-se que maiores valores de rendimento de reação (Y) e de massas moleculares, bem como de maior velocidade de reação foram obtidos para os experimentos realizados com a razão de S/M de 2:1.

No entanto, reduções bruscas e expressivas nos valores de Y foram observadas com o processamento contínuo de reagentes por uma mesma carga de enzimas para todas as condições reacionais testadas. Neste contexto, testes de atividade enzimática evidenciaram a manutenção da atividade enzimática em até 97% para as enzimas analisadas (OLIVEIRA et al., 2006; FIAMETTI, 2008; KRÜGER, 2010) após seu uso em reações de e-ROP de ϵ -CL por até 12 tempos espaciais (ver seção 4.1.1). Desta forma, a diminuição na conversão monomérica (Y) pode ser devido ao acúmulo ou adsorção de material polimérico e/ou monomérico sobre as enzimas imobilizadas e não à perda da atividade enzimática durante as reações.

Apesar de o scCO₂ ter efeito plastificante sobre o polímero policaprolactona (diminui a sua temperatura de fusão), sabe-se que o polímero é insolúvel ou muito pouco solúvel em scCO₂ (LOEKER et al., 2004). Logo, o material depositado sobre as enzimas pode ser devido à precipitação do polímero no decorrer da reação de e-ROP.

Por não possuir momento dipolar mesmo a elevadas densidades o dióxido de carbono possui habilidade muito limitada de dissolver moléculas polares. No entanto, a polaridade do scCO₂ pode ser modificada pela adição de cossolventes ou modificadores. Sabe-se ainda que a polaridade de um solvente está intimamente ligada às propriedades físicas e químicas das moléculas, exercendo influência sobre o ponto de fusão, o ponto de ebulição e a solubilidade das mesmas em determinado solvente (MORRISON; BOYD, 1996).

Desta forma, o uso de um cossolvente com poder de solubilização tanto para o polímero quanto para o monômero pode não só diminuir ou eliminar esse acúmulo de material sobre as enzimas, como também auxiliar na transferência de massa no meio reacional (monômero + polímero + solvente/cossolvente) objetivando diminuir a viscosidade do sistema como um todo. Cabe lembrar que, a diminuição da viscosidade do sistema e, por conseguinte a diminuição nas perdas de carga observadas na seção anterior (seção 4.1) pode resultar em produtos (polímeros) de melhor qualidade.

4.2.1 Efeito do uso de cossolvente nas reações de e-ROP realizadas com scCO₂

Por razões demonstradas anteriormente (seção 2.4) optou-se pelo uso inicial de diclorometano (DCM) como cossolvente nas reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema contínuo. Neste contexto, foram fixadas as condições experimentais de 120 bar e razões mássicas solvente/mistura de reagentes (S/MIX) de 2:1 e de 1:2, sendo, S o solvente scCO₂ e MIX a mistura de reagentes [50 % de monômero (ϵ -CL) + 50 % de cossolvente (DCM)]. Maiores detalhes sobre o preparo das misturas de reagentes (ϵ -CL + DCM), bem como do teor de água e do método adotado para o escoamento desta mistura até o reator PBR são descritos na seção 3.2.1.2.

Além disso, o teor de água da enzima (Novozym 435) utilizada nas reações de e-ROP de ϵ -CL foi fixado em 1,15 % enquanto que da mistura de reagentes (MIX) o teor de água foi de 0,04 % (ver seção 3.1) para todos os ensaios experimentais apresentados nesta seção (seção 4.2.1). Ainda, visando uma melhor apresentação e comparação dos dados experimentais obtidos para a produção de PCL com o uso de cossolvente, os tempos espaciais (τ) foram ajustados pela modificação nas vazões das bombas SP e HPLP (ver seção 3.2), para serem os mesmos para ambas as condições de razão S/MIX de 2:1 e 1:2.

A Tabela 4.3 apresenta os resultados de rendimento das reações Y (%), de massa molecular (M_n) e (M_w) e de índice de polidispersão (PI) das reações de e-ROP de ϵ -CL obtidos a 65 °C na condição de 120 bar e razões mássicas (S/MIX) de 2:1 e 1:2 respectivamente.

Como esperado, quanto maior o tempo de permanência dos reagentes dentro do reator PBR (Tabelas 4.3), melhores são os resultados obtidos em termos de Y (%), M_n e M_w e IP para os polímeros obtidos.

Uma rápida análise dos dados experimentais apresentados na Tabela 4.3 nos remete a uma comparação destes com aqueles resultados obtidos na seção 4.1 sob mesmas condições de pressão, porém sem o uso de cossolvente. Neste contexto, os maiores rendimentos de reação (Y %) observados para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e com o uso de cossolvente foram de 94,1 % e 94,6 % para as reações realizadas a razão S/MIX de 2:1 e 1:2 respectivamente enquanto que, para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar sem o uso de cossolvente foram de 60,1 % (S/M = 2:1) e 50,9 % (S/M = 1:2) respectivamente (Tabela 4.1).

Tabela 4.3 - Resultados de Y, M_n , M_w e IP para as reações de polimerização a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2 respectivamente.

tempo (min.)	^a S/MIX = 2:1				S/MIX = 1:2			
	Y (%)	Mn (Da)	Mw (Da)	IP	Y (%)	Mn (Da)	Mw (Da)	IP
30,0	94,1	23100	34200	1,5	94,6	14200	22800	1,6
15,0	93,3	22500	33800	1,5	70,1	14500	22100	1,5
10,0	84,5	21900	34500	1,6	55,0	12100	18200	1,5
5,0	55,0	13800	18300	1,3	42,4	10100	14900	1,5
3,0	35,3	11200	16800	1,5	34,5	8500	12400	1,5
1,5	30,8	8800	12600	1,4	30,3	4300	6100	1,4

^a Onde, S/MIX = S (scCO₂) e MIX = (50 % de ε-CL + 50 % de DCM).

Em termos de M_n , os maiores valores obtidos nesta seção foram de: 23100 Da para as reações realizadas a 120 bar e razão solvente/mistura de reagentes (S/MIX) de 2:1, enquanto para as reações realizadas a 120 bar e razão S/MIX de 1:2 foram de 14200. Se comparar-se com as reações realizadas anteriormente (sem o uso de cossolvente) observamos que os valores de M_n das reações realizadas a 120 bar e razão (S/MIX) de 1:2 atingiu menores valores de M_n do que as reações realizadas sob razão S/M 1:2. Já as reações realizadas a razão S/MIX de 2:1 apresentam valores de M_n maiores que aqueles apresentados para o sistema realizado sem cossolvente e razão S/M: 1:2.

Observa-se ainda uma expressiva melhora nos valores de índice de polidispersão (IP) para as reações realizadas com o uso de cossolvente, as quais variaram numa faixa de (1,3 a 1,6) para os polímeros obtidos enquanto para as reações sem cossolvente (seção 4.1) foram de 1,5 a 2,1.

Além disso, os valores de perda de carga atingiram valores máximos (para os maiores tempos espaciais testados) de cerca de 21 % da pressão inicial (~25 bar) para ambos os sistemas testados nesta seção (S/MIX de 2:1 e 1:2), enquanto que para as reações realizadas sem o uso de cossolvente as perdas de carga atingiram valores entorno de 35 bar (29,2 % e 17,6 % para os experimentos realizados a 120 e 200 bar respectivamente). Cabe salientar que, dados de viscosidade do sistema não foram obtidos experimentalmente para os meios reacionais testados

seja com ou sem o uso de cossolvente. Porém a diminuição na perda de carga, bem como o aumento na velocidade das reações experimentais (para os sistemas com cossolvente), evidenciado pelos altos valores de conversão (Y) em menor tempo, pode ser devido à uma diminuição da viscosidade e melhora na transferência de massa do sistema como um todo. A diminuição na viscosidade do sistema pode explicar a diminuição na perda de carga, bem como melhoras significativas observadas no escoamento dos produtos de reação (polímero + monômero não reagido + solvente/cossolvente) que passou a oscilar em menor amplitude (maior constância no escoamento dos produtos reacionais) em relação aos dados obtidos sem o uso de cossolvente (seção 4.1). Neste contexto, é consenso na literatura especializada em biopolímeros biodegradáveis e biorreabsorvíveis, que reduções da viscosidade do meio reacional de produção de policaprolactona auxiliam na polimerização uma vez que facilitam a difusão do iniciador (ex. água) e do monômero para a fase polimérica (FANOVICH; JAEGER, 2012; TAI et al., 2007; LIAN et al., 2006) e/ou para os sítios ativos da enzima.

Para uma melhor visualização e avaliação dos resultados experimentais de Y, M_n , M_w e IP, estes são apresentados nas Figuras 4.20, 4.21, 4.22 e 4.23, respectivamente, para ambas as razões S/MIX (2:1 e 1:2) testadas em reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente (DCM) sob mesma pressão (120 bar) e temperatura de 65 °C.

Figura 4.20 - Resultados de rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL realizados a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.

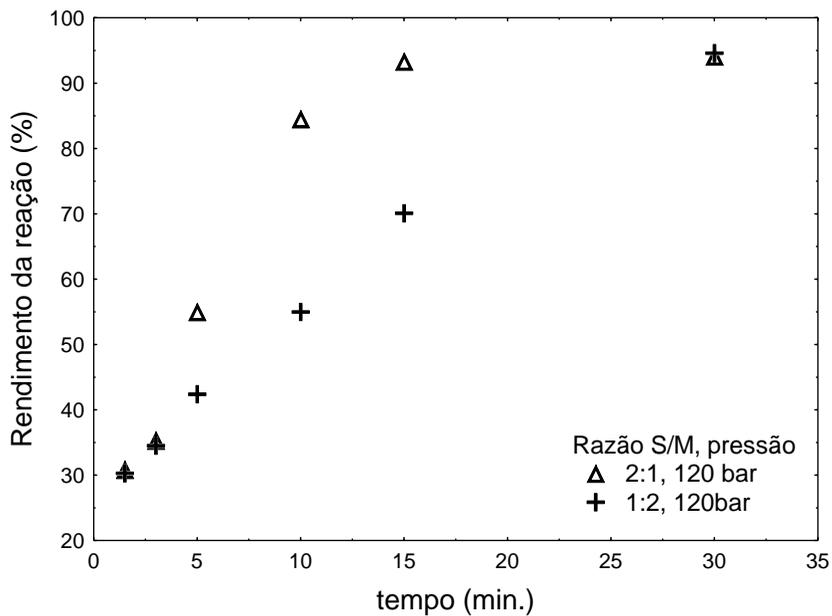


Figura 4. 21 - Resultados de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.

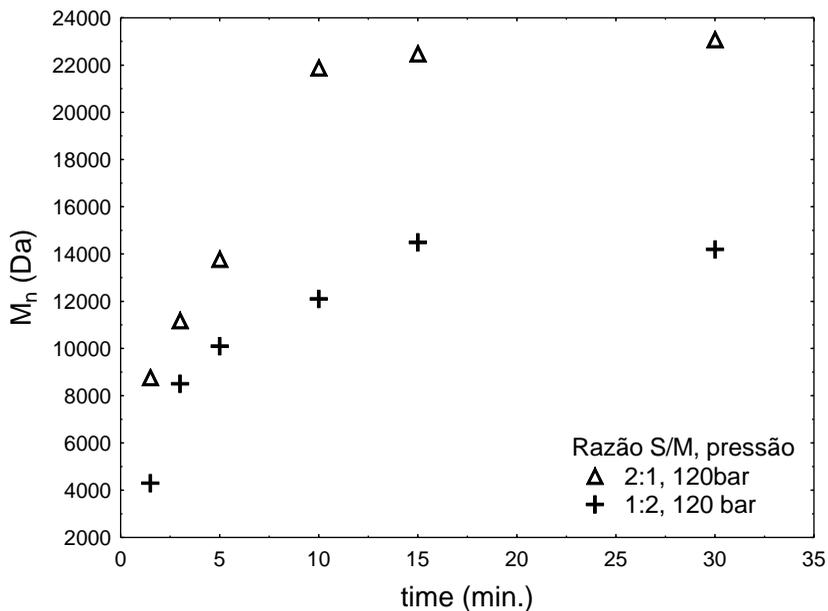
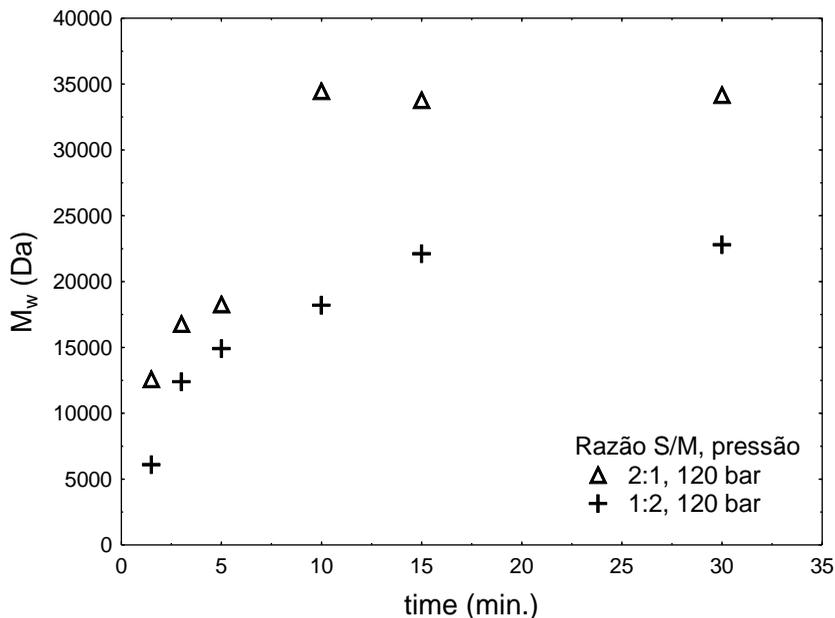


Figura 4.22 - Resultados de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.

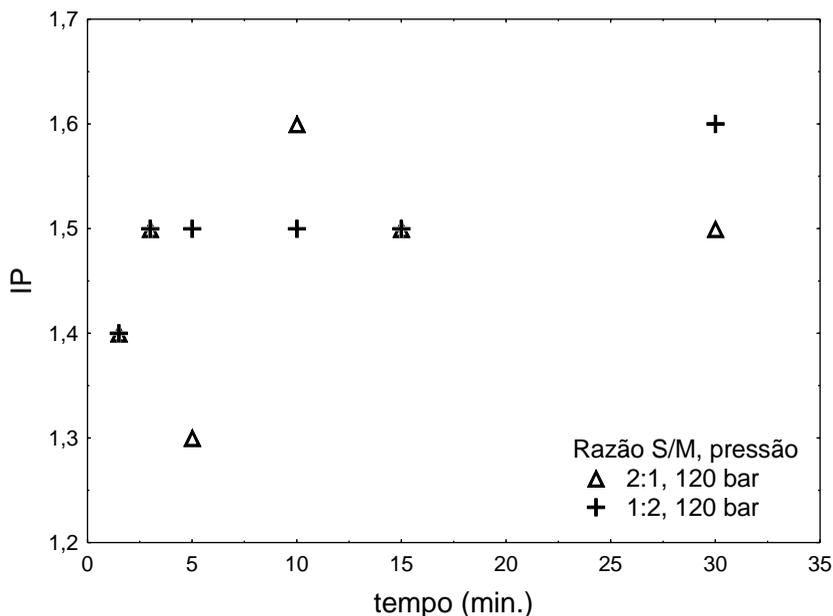


Observa-se nessas figuras (Figura 4.20, 4.21 e 4.22) que as reações realizadas sob razão S/MIX de 2:1 resultaram nos maiores valores de Y , M_n e M_w , bem como em maiores velocidades de reação. Estas figuras demonstram ainda que, para as reações realizadas sob razão S/MIX de 2:1, as reações atingem valores máximos de conversão em 15 minutos de reação e então se mantêm constantes. Neste contexto, alguns estudos (KUNDU et al., 2011; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; GEUS 2007) demonstram que a enzima Novozym 435 pode degradar PCL por cisão da cadeia. No entanto, a velocidade de degradação é mais lenta do que a velocidade de polimerização. Logo, essa constância nos valores de M_n e M_w após 15 minutos de reação pode ser devido a um equilíbrio entre as reações de polimerização e degradação realizadas pela enzima que ocorrem simultaneamente no meio reacional (KUNDU et al., 2011; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; KOBAYASHI et al., 2000).

Na a Figura 4.23 observa-se que, as reações de e-ROP para ambas as razões S/MIX testadas nesta seção (seção 4.2.1) apresentam comportamento muito parecido para os valores de índice de polidispersão (IP), demonstrando uma distribuição em torno de 1,5.

Figura 4.23 - Resultados de IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX de 2:1 e 1:2.

Fonte: O autor.



4.2.1.1 Produção de PCL com uso de cossolvente em PBR para períodos prolongados

Esta seção objetivou avaliar o efeito do uso de um cossolvente sob as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em modo contínuo, visando reduzir as bruscas diminuições de rendimento (Y) e massas moleculares (M_n e M_w) observadas na seção (4.1) quando a mesma carga de enzimas foi usada por períodos prolongados de reação. Para tanto, o DCM foi usado como cossolvente nas reações de polimerização com o objetivo de auxiliar na transferência de massa do sistema, bem como diminuir ou

eliminar o acúmulo de material polimérico sobre as enzimas observado (seção 4.1) durante as reações de e-ROP de ϵ -CL sem o uso de cossolvente para longos períodos de tempo das reações. As Tabelas C.1 e C.2 apresentam respectivamente os resultados de Y para as reações de polimerização realizadas a 120 bar e razões S/MIX de 2:1 e 1:2. Estes resultados de Y são também apresentados de forma gráfica nas Figuras 4.24 e 4.25, respectivamente. Cabe salientar que estes dados, assim como os dados apresentados na seção (4.1.1.2) foram realizados de forma a avaliar a manutenção da atividade enzimática observada pela avaliação dos valores obtidos de Y e M_n nas reações de polimerização. Desta forma, as reações de polimerização foram realizadas por pelo menos 6 tempos espaciais (τ) para cada condição reacional de razão S/MIX e τ , ou seja, 6 amostras (polímeros) coletadas (para posterior análise de Y e massas moleculares) para a mesma carga de enzimas. Nesta seção, as coletas poliméricas (acondicionadas em recipientes apropriados) foram realizadas a cada tempo espacial (1 τ) por 6 vezes cada experimento, ou seja 6 amostras poliméricas obtidas com a mesma carga de enzimas no PBR.

Observa-se nas Figuras 4.24 e 4.25 que ambas as condições de razão S/MIX (2:1 e 1:2) utilizadas conferem boa constância nos valores de rendimento das reações (Y). Se compararmos os resultados de Y obtidos nesta seção (com o uso de cossolvente) com os resultados obtidos anteriormente (sem o uso de cossolvente), observa-se uma melhora considerável para ambos os sistemas (razão S/MIX de 2:1 e 1:2) devido ao uso de DCM. Um bom exemplo disso pode ser dado pelo valor de Y para o sistema realizado anteriormente (sem cossolvente) a 120 bar e razão S/M (solvente/monômero) de 2:1 para tempos espaciais de 10,7 min. que diminui de 60,1 % para 24,3 % após 6 τ (Tabela B.1). Enquanto isso, para o sistema realizado com cossolvente a 120 bar e razão S/MIX (solvente/mistura de reagentes) de 2:1 para tempos espaciais de 10 min. o valor de Y manteve-se constante em torno de 85,0 % mesmo após 6 τ (Tabela C.1).

A menor variância nos valores de Y observada para as reações de polimerização com a adição de DCM pode ser devido a uma melhora na transferência de massa do sistema, bem como da possível remoção do material depositado ou adsorvido sobre a enzima.

Figura 4.24 – Rendimento para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

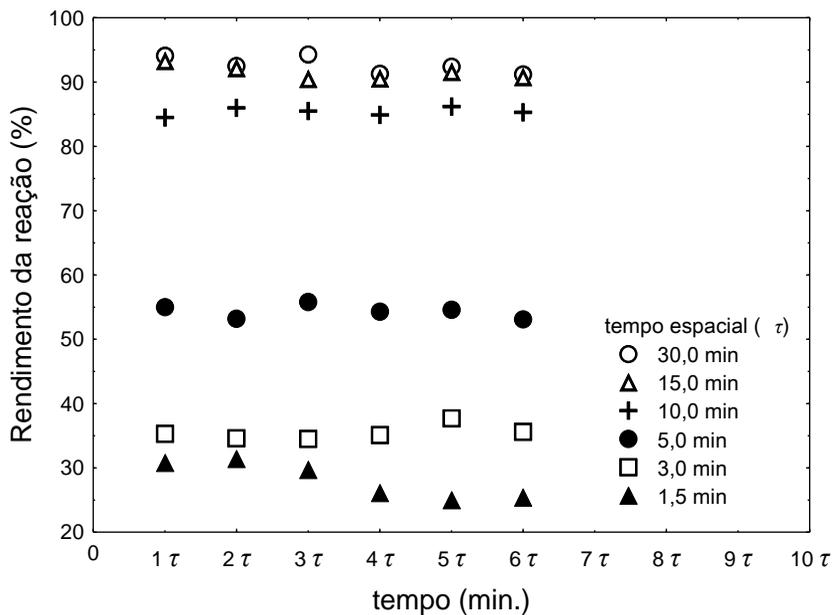
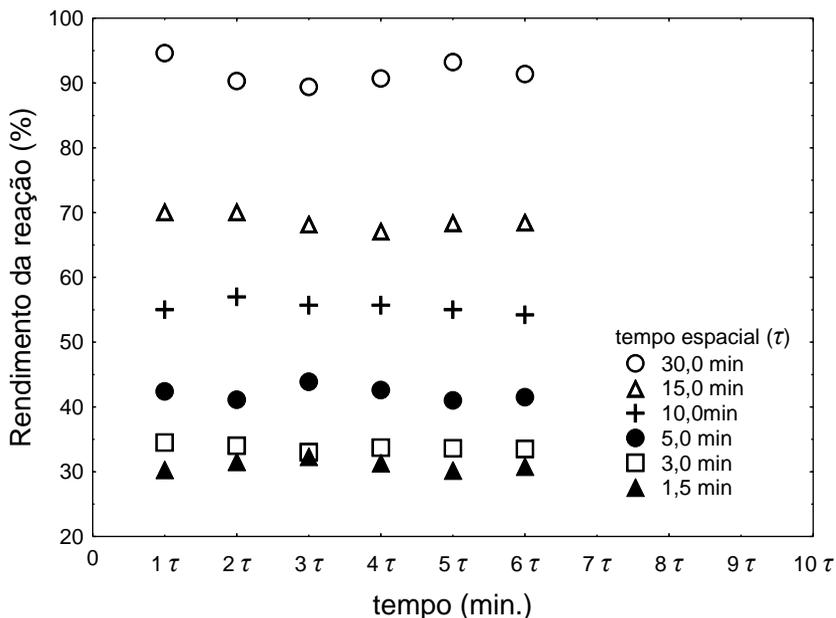


Figura 4.25 – Rendimento para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.



As Tabelas C.3 e C.4, bem como as Figuras 4.26 e 4.27 apresentam os resultados de M_n para as reações de polimerização realizadas a 120 bar e razões S/MIX de 2:1 e 1:2 respectivamente.

Observa-se nestas figuras (4.26 e 4.27) que os valores de M_n diminuem progressivamente com processamento contínuo dos reagentes e esta diminuição é ainda mais acentuada para os experimentos realizados com maiores tempos espaciais τ . Tais tendências também foram observadas para as polimerizações realizadas anteriormente (sem cossolvente) devido ao acúmulo de material sobre as enzimas. No entanto, a análise da atividade enzimática demonstrou que as enzimas mantiveram sua atividade em torno de 97 % para ambas as condições de razão S/MIX. Além disso, a precipitação em etanol gelado, das misturas (THF+DCM+monômero não reagido) resultantes da lavagem das enzimas após as reações de e-ROP de ϵ -CL com cossolvente (DCM), não demonstraram a presença de polímero sobre a enzima (vide seção 4.1.1.2).

Neste contexto, a diminuição nos valores de Y e M_n com o processamento contínuo de reagentes durante longos tempos de reação de polimerização foi creditada à quantidade de água presente no sistema. Sabe-se que a presença de água além da quantidade necessária para manter a atividade enzimática e iniciar as reações de polimerização pode causar vários tipos de reações secundárias como transesterificações intracadeia e/ou degradação das cadeias poliméricas (KUNDU et al., 2011; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; KOBAYASHI et al., 2000). Logo, um melhor controle sobre a quantidade de água no meio reacional pode resultar não só em maiores valores de Y e M_n , mas também em maiores estabilidades para estas variáveis com o processamento contínuo dos reagentes com a mesma carga de enzimas.

Figura 4.26 – Valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

Fonte: O autor.

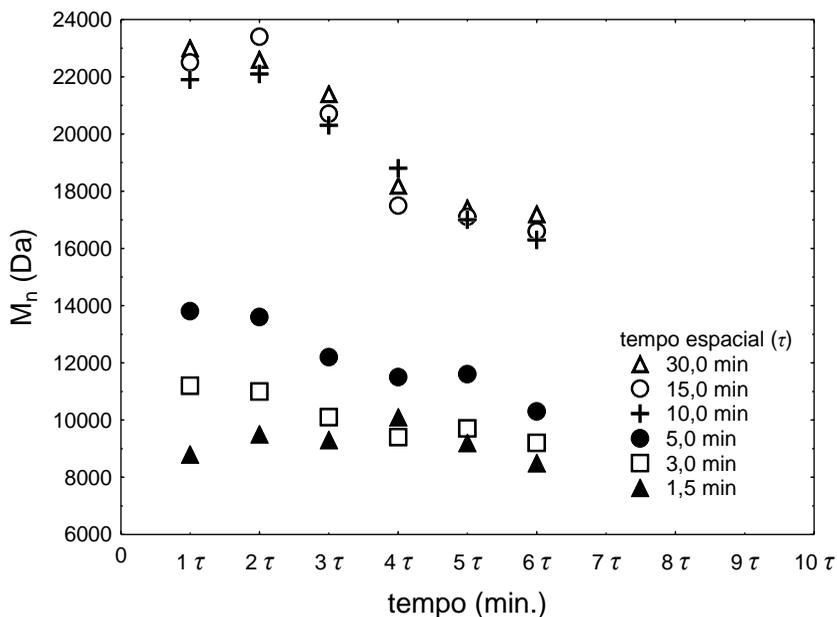
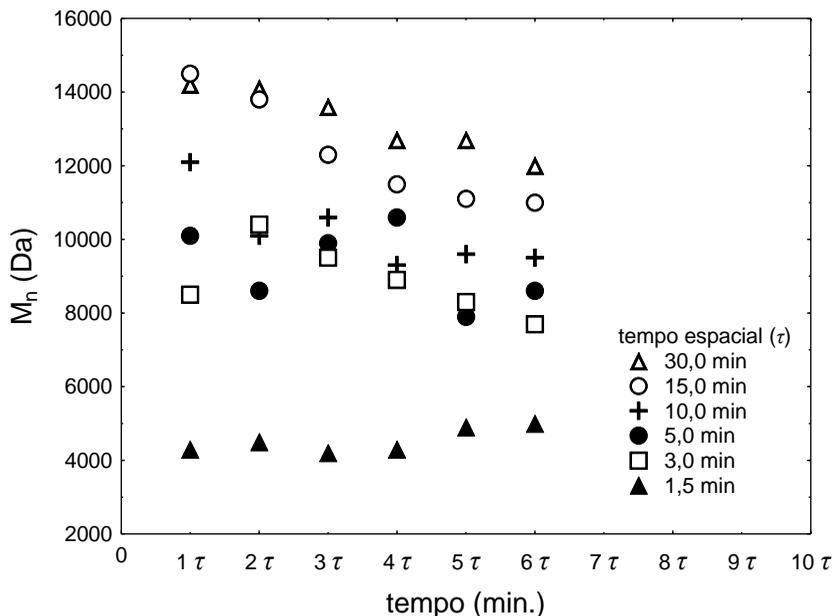


Figura 4.27 – Valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.
Fonte: O autor.



4.2.1.2 Efeito do controle da quantidade de água no meio reacional sobre as reações de e-ROP

A quantidade de água presente no meio reacional se tornou uma das variáveis de maior impacto nas propriedades finais dos polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis, principalmente no que tange a conversão monomérica e as massas moleculares. Pois uma quantidade de água maior do que a necessária para manutenção da atividade enzimática resultará na obtenção de polímeros de baixa massa molecular. Já uma quantidade de água menor do que esta pode levar a uma diminuição na atividade enzimática, afetando assim a reação de e-ROP como um todo (KUNDU et al., 2011; THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; SIVALINGAM et al., 2003; MEI et al. 2003; MEI et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2000).

Neste contexto, diferentes tratamentos (físicos e químicos) têm sido investigados com o objetivo de reduzir a quantidade de água na enzima e nos reagentes sem a perda da atividade enzimática durante reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema de batelada (GEUS 2007; THURECHT et al., 2006; GEUS et al., 2005; LOEKER et al., 2004; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; MEI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2000).

No entanto, o controle da quantidade de água ótima para as reações de e-ROP realizadas em fluxo contínuo é de maior complexidade de definição do que em sistemas de batelada. Isso porque a quantidade de água no meio reacional (oriunda da enzima e dos reagentes) muda constantemente devido à quantidade de água inserida continuamente no meio reacional através dos reagentes usados como substrato para a obtenção dos polímeros, bem como pelo consumo da água utilizada como nucleófilo iniciador das reações (Ver seção 3.1.1).

Portanto, o controle inadequado das quantidades de água nos reagentes inseridos continuamente no meio reacional (sistema contínuo) pode: i) afetar a polimerização e causar a degradação da policaprolactona pela cisão de cadeias poliméricas (por hidrólise) com o excesso de água no meio (THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; SIVALINGAM et al., 2003; MEI et al., 2003; MEI et al., 2002); ii) Ou diminuir a atividade da enzima pela falta de água no meio ocasionado pelo uso contínuo da água como nucleófilo iniciador das reações, o que afeta as reações de e-ROP como um todo (KUNDU et al., 2006).

Isso nos leva a necessidade do estudo da quantidade ótima de água inserida não só inicialmente no meio reacional (ex. sistema em batelada), mas também da quantidade de água inserida constantemente no meio (sistema contínuo) pelos reagentes.

Desta forma objetivando definir uma faixa ótima de água (teor de água %) para as reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema contínuo realizados no presente trabalho, foram realizados experimentos iniciais de forma a fornecer informações sobre a atividade residual da enzima. Para tanto reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema contínuo foram usadas como sistema modelo ($\text{scCO}_2 + \epsilon\text{-CL} + \text{DCM}$) em reações realizadas com as variáveis fixas de 120 bar, 65 °C e razão S/MIX de 2:1 para tempos espaciais (τ) de 15 min. A escolha das condições de pressão, razão S/MIX e tempo espacial (τ) utilizadas foi realizada a partir das otimizações realizadas pelos experimentos realizados nas seções anteriores (seções 4.1 e 4.2.1).

Além disso, uma condição de 0,04 % de água na corrente de entrada dos reagentes (ϵ -CL + DCM) foi mantida fixa (ver seção 3.1.1) para várias condições de água inicial na enzima (1,15; 0,69; 0,28; 0,1 %).

Neste contexto, as Figuras (4.28 e 4.29) apresentam respectivamente os resultados de Y e M_n obtidos para as reações de polimerização realizadas a 120 bar, 65 °C e razões S/MIX de 2:1 obtidos em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos. Os dados tabelados de Y e M_n usados na construção destes gráficos podem ser observados no Apêndice C pelas tabelas C.5 e C.6.

Figura 4.28 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) no rendimento das reações Y de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.

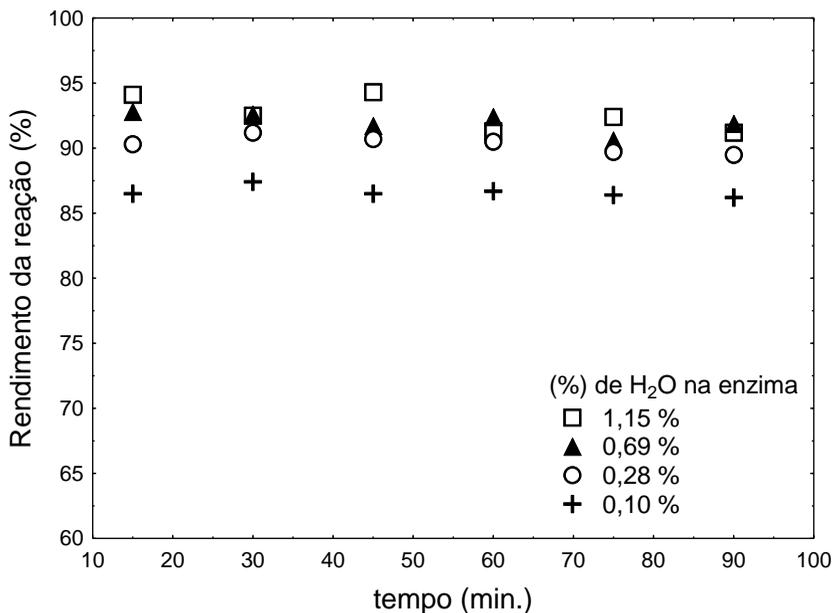
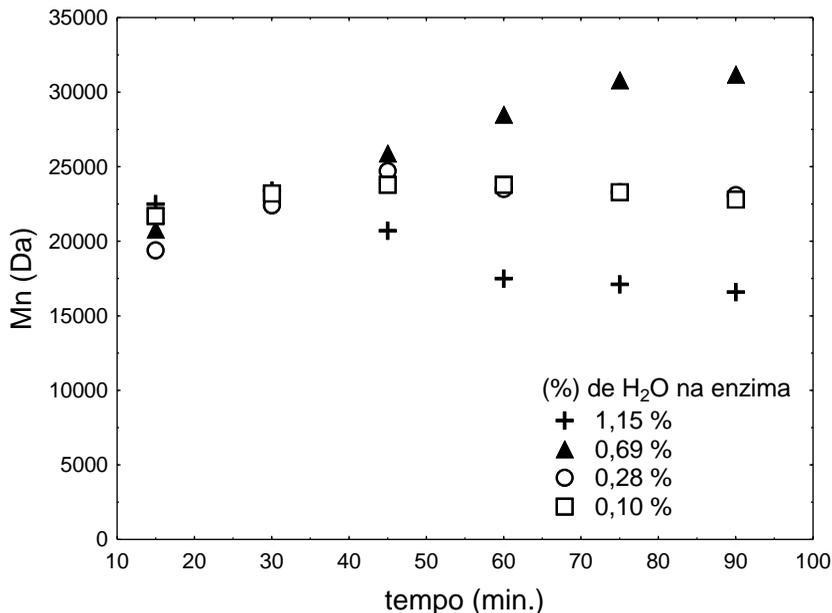


Figura 4.29 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) nos valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.



Analisando a Figura 4.28 observa-se que, exceto pela condição experimental realizada a 0,10 % de água na enzima, as demais condições de teor de água inicial na enzima (1,15; 0,69 e 0,28 %) apresentam valores de Y muito similares entre si, com variação de menos de 5 % de rendimento entre os experimentos realizados. Os maiores e menores valores de Y (Tabela C.5) foram de 94,1 % (1,15 % de água na enzima) e 86,2 % (0,10 % de água na enzima) respectivamente. O rendimento das reações (Y) apresenta constância ou estabilidade dos seus valores máximos para todas as condições testadas de conteúdo de água inicial na enzima por até 6 τ (90 min.) de reação realizada com a mesma carga de enzimas.

Quanto à Figura 4.29 observa-se que, até o terceiro tempo espacial (45 min. de reação) não há grandes diferenças nos valores de M_n para todos os conteúdos de água testados na enzima. No entanto a partir do quarto tempo espacial os valores de M_n obtidos para a

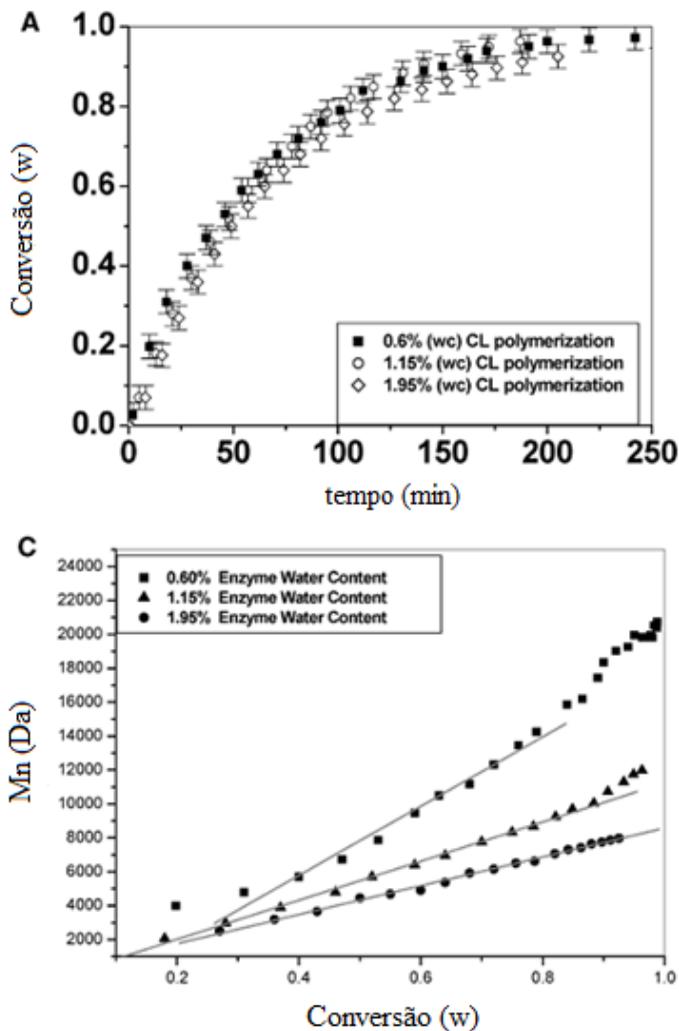
concentração de 0,69 % de água na enzima continuam a aumentar enquanto que, para as condições de 0,28 e 0,10 % os valores de M_n estabilizam (começam a ficar constantes) e os valores de M_n para a condição de 1,15 % (de água na enzima) diminuem expressivamente. Os valores máximos e mínimos obtidos após 6τ (90 min.) de reação são de 31200 Da e 16600 Da (Tabela C.6) para os experimentos realizados a condições de 0,69 % e 1,15 % (de água na enzima) respectivamente.

Fica evidente por estes resultados de Y e M_n que, para os teores de água inicial na enzima testados neste trabalho, melhores resultados em termos de qualidade do polímero desejado podem ser obtidos com a quantidade de 0,69 % de água na enzima.

O comportamento demonstrado pelas Figuras 4.28 e 4.29 é muito similar ao apresentado por Mei et al. (2003) para e-ROP de ϵ -CL realizado em batelada usando tolueno como solvente (Figura 4.30). No trabalho desses autores também foi observada pouca mudança na conversão monomérica com o aumento de água na enzima (%), porém os valores de M_n (assim como no presente trabalho) diminuem acentuadamente para valores de conteúdo de água maiores que 0,60 (%).

Figura 4.30 - Efeito do conteúdo de água na enzima (%) para os valores de Y (%) e M_n nas polimerizações de ϵ -CL realizadas a 60°C usando tolueno como solvente e a lipase Novozym 435 como catalisador. Onde, (A) efeito da água em Y e (C) efeito da água em M_n .

Fonte: Mei et al., (2003).



Porém vale lembrar que, além do controle de água inicial na enzima, se faz necessário um controle sobre a entrada de água (no sistema) oriunda dos reagentes. Desta forma, faz-se necessário também, a realização de experimentos com diferentes quantidades de água (%) nos reagentes que alimentam o sistema. Para tanto, a condição de 0,69 % de água inicial na enzima foi adotada como fixa, por esta condição resultar em melhores desempenhos nas reações de e-ROP. As quantidades de água nos reagentes (ϵ -CL + DCM) foram de 0,04; 0,09; 0,14; 0,54 e 1,04 % de água na mistura de reagentes (MIX), já para o $scCO_2$ a quantidade de água foi considerada nula (para fins de simplificação), porém uma maior precisão da região de ótimo na quantidade de água no meio reacional de e-ROPs em modo contínuo pode ser obtida ao se levar em consideração a água presente no CO_2 .

Desta forma, as Figuras 4.31 e 4.32 apresentam respectivamente os resultados de Y e M_n obtidos para as reações de polimerização realizadas a 120 bar, 65 °C e razões S/MIX de 2:1 obtidos em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos e quantidade de água inicial na enzima de 0,69 % e para diferentes quantidades de água na corrente de entrada de reagentes (MIX) no PBR. Os dados utilizados para a construção das figuras abaixo são apresentados nas Tabelas C.7 e C.8.

Observa-se na figura 4.31 e tabela C.7 que quantidades de água acima de 0,04 % na mistura de reagentes (MIX) resultam em poucas alterações nos rendimentos de reação até 0,14 % de água em (MIX). Porém quantidades de 0,54 % de água ou mais na mistura (MIX), provocam uma leve diminuição na conversão monomérica (Y). Os valores de IP para as reações de e-ROP realizadas nesta seção (4.2.1.2) tiveram uma dispersão em torno de valores de 1,5 e 1,6 (IP).

Quanto ao efeito da quantidade de água na mistura (MIX) para os valores de M_n , observa-se uma diminuição gradual nas massas moleculares com o aumento da água no meio reacional (Figura 4.32). Os valores máximos e mínimos de M_n após 6 τ (90 min. de reação) são observados para as condições de menor e maior quantidade de água na mistura respectivamente. A saber, 31200 Da para as reações realizadas com 0,04 % de água em MIX e 8800 Da para as reações realizadas com 1,04 % de água em MIX. Não é novidade na literatura (THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; SIVALINGAM et al., 2003; MEI et al., 2003; MEI et al., 2002) que menores quantidades de água nos reagentes usados em e-ROPs de ϵ -CL resultam (ver seção 2.3.2) em maiores massas moleculares (M_n e M_w). No entanto, quantidades de água menores do que 0,04 % não puderam

ser obtidas com o método de secagem adotado (seção 3.1.1). Cabe salientar ainda que, uma pequena quantidade de água (oriunda do CO_2) deve estar entrando continuamente no sistema, porém esta foi desprezada para fins de simplificação na análise dos efeitos da água sobre as reações de e-ROP do presente trabalho.

Figura 4.31 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) no rendimento das reações (Y) de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.

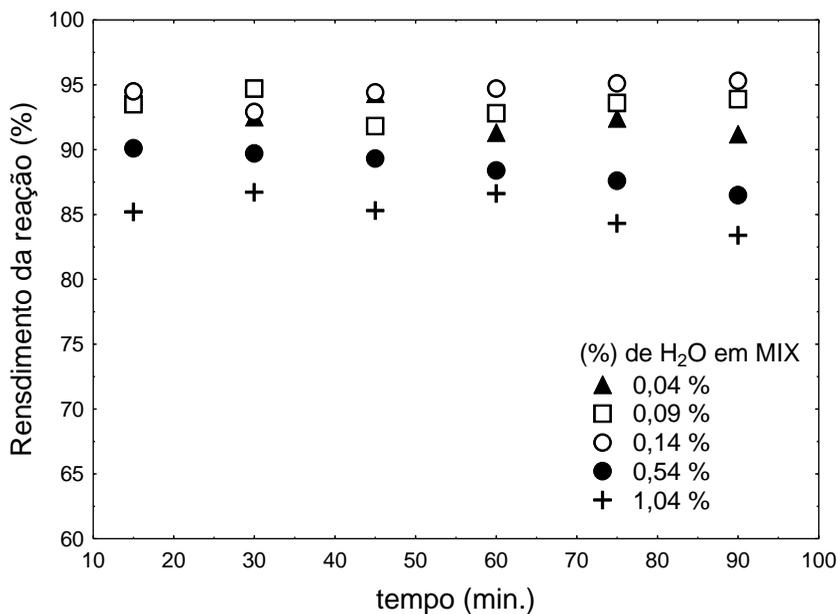
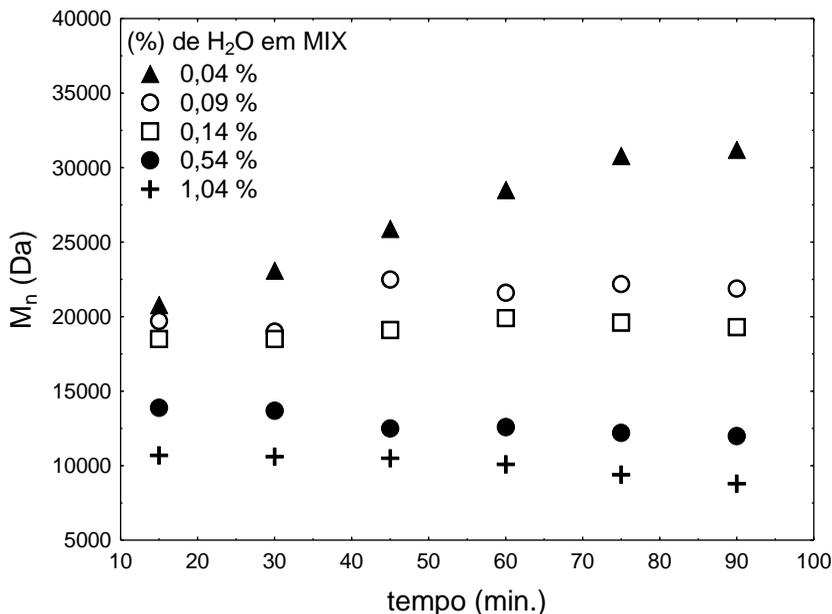


Figura 4.32 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) nos valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.



4.2.1.3 Efeito de diferentes cossolventes nas reações de e-ROP

A avaliação do efeito de diferentes solventes em reações de e-ROP de ϵ -CL é uma prática bastante comum na literatura e uma excelente revisão a respeito dos tipos de solventes, bem como resultados de rendimento de reação e massas moleculares (M_n e M_w) obtidas com estes solventes pode ser observada no trabalho de Labet e Thielemans (2009). No entanto, o uso de solventes orgânicos como cossolvente em reações de e-ROP de ϵ -CL com fluido pressurizado é escasso. A prática do uso de cossolvente em meio pressurizado por CO_2 é bastante comum em extrações com fluidos supercríticos (SFE) quando se deseja extrair compostos de alta polaridade normalmente não solúveis em CO_2 devido à sua baixa polaridade. Isso porque a adição de um cossolvente com polaridade maior do que a do CO_2 aumenta a polaridade da mistura e, portanto, aumenta a solubilidade de certos solutos ou classes de

compostos polares no fluido supercrítico (PEREIRA, 2005; ALMEIDA, 2006).

Neste contexto, objetivando definir o melhor cossolvente para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em modo contínuo e usando scCO₂ como solvente, diferentes cossolventes como, diclorometano (DCM), tetraidrofurano (THF) e tolueno (TOL) foram avaliados quanto a seus efeitos nas reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em modo contínuo. As Figuras 4.33 e 4.34 e Tabelas C.9 e C.10 apresentam respectivamente o efeito destes solventes sobre os valores de rendimento de reação (Y) e de M_n para as reações de polimerização realizadas no PBR. Cabe salientar que, para a obtenção dos dados experimentais desta seção (4.2.2), reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas sob condições experimentais fixas de 120 bar, 65 °C, razão S/MIX de 2:1 e tempos espaciais (τ) fixos de 15 min foram usadas como modelo. As condições de água inicial na enzima (0,69 %) e na MIX (0,04 %) também foram mantidas constantes para as reações realizadas com os três cossolventes usados. As misturas de reagentes MIX usadas nas reações de polimerização foram de (50 % de ϵ -CL + 50 % de cossolvente), onde os cossolventes usados foram: DCM ou Tolueno ou THF. Todas as misturas foram preparadas com a mesma composição mássica de monômero e cossolvente.

Os solventes orgânicos usados (DCM, tolueno e THF) como cossolventes foram escolhidos por apresentarem uma boa solubilidade tanto do monômero (ϵ -CL) quanto do polímero (policaprolactona) presentes no meio reacional (BORDES et al., 2010). Além disso, tanto o Tolueno como o THF têm sido vastamente usados em reações de e-ROP de ϵ -CL (ZHANG et al. 2012; KUNDU et al. 2011; LABET e THIELEMANS, 2009).

Figura 4.33 - Efeito do tipo de solvente nos rendimentos de reação para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.

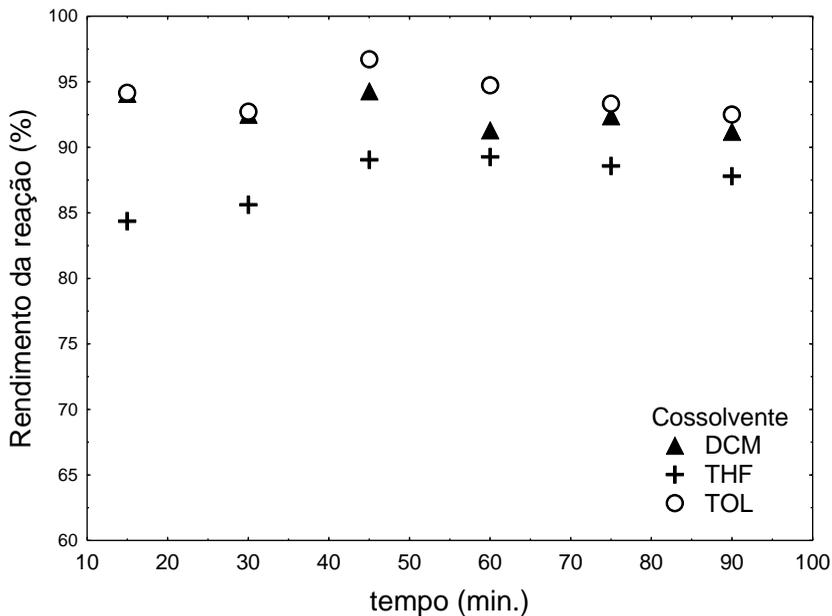
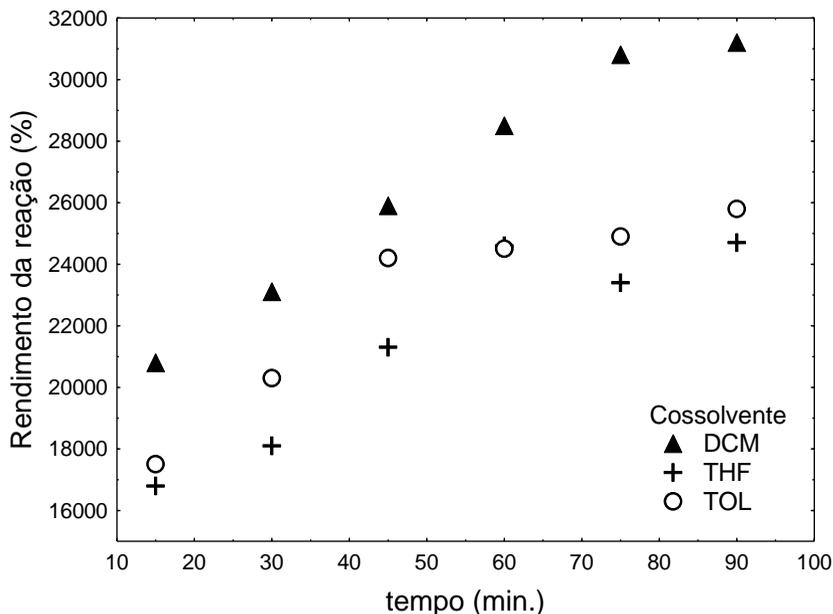


Figura 4.34 - Efeito do tipo de solvente nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.



Observa-se nestas figuras (4.33 e 4.34) que o uso de DCM ou de tolueno como cossolventes nas reações de polimerização resultou em rendimentos de reação muito similares (92 %) enquanto que com o uso de THF como cossolvente os rendimentos foram um pouco menores (87 %). No entanto, para os valores de M_n observa-se que o uso de DCM como cossolvente ainda foi a melhor escolha resultando em valores de M_n de 31200 Da após 6 tempos espaciais (90 min.) de reação. Já para o uso de Tolueno ou THF como cossolvente nas reações de polimerização resultaram em valores de M_n de 25800 Da e 24700 Da respectivamente após 6 tempos espaciais (90 min.) de reação.

O uso de tolueno em reações de polimerização em solução (polimerizações realizadas com o uso de solventes) é considerado um dos melhores solventes orgânicos (ZHANG et al. 2012; KUNDU et al. 2011; LABET e THIELEMANS, 2009; KUMAR e GROSS, 2000; KUMAR et al., 2000), o qual tem demonstrado vantagem frente ao uso

do THF em reações de polimerização no que se refere à obtenção de maiores valores de conversão monomérica (Y) e massas moleculares (M_n). No entanto, o uso de DCM para reações de e-ROP de (ϵ -CL) tem sido pouco explorado até o momento (LABET e THIELEMANS, 2009).

Neste contexto, cabe salientar-se que, além do DCM ter maior potencial de solubilização da policaprolactona do que o tolueno e o THF (BORDES et al., 2010), ainda apresenta excelente afinidade pelo CO₂ (BENDER et al., 2010; PRIAMO et al., 2010; FRANCESCHI et al., 2008), características que podem ter ajudado na transferência de massa do sistema auxiliando na difusão do monômero (ϵ -CL) e do nucleófilo (água) até os sítios ativos enzimáticos. Por isso, obteve-se melhores resultados com o DCM em relação aos demais solventes orgânicos testados como cossolvente.

Ainda, o DCM está sendo largamente usado com sucesso na produção de *scaffolds* poliméricos (ELOMAA et al., 2011; XIE et al., 2009; CHEW et al., 2008; SANGSANOH et al., 2007; YANG et al., 2005; KWON et al., 2005) sem afetar o cultivo e crescimento de diferentes tipos de células (ex. células tronco mesenquimais) testadas experimentalmente. Esse uso em *scaffolds* é devido ao DCM apresentar elevada pressão de vapor possibilitando sua separação com facilidade dos produtos poliméricos finais, o que evita os problemas de toxicidade (JÉRÔME; LECOMTE, 2008) gerados em células cultivadas sobre *scaffolds* poliméricos quando na presença de resíduos de solventes orgânicos (ELOMAA et al., 2011; XIE et al., 2009; CHEW et al., 2008; SANGSANOH et al., 2007; YANG et al., 2005; KWON et al., 2005).

Sabe-se ainda que, as preocupações ambientais decorrentes de solventes voláteis (JÉRÔME; LECOMTE, 2008) e/ou fisiológicas decorrentes de potenciais resíduos de solventes orgânicos em dispositivos para liberação de fármacos ou para implantes biomédicos têm norteado as pesquisas na área de polímeros biodegradáveis e/ou biorreabsorvíveis (ROSSO COMIM et al., 2013; SANTOS et al., 2012; ZHANG et al. 2012; KUNDU et al. 2011; LABET e THIELEMANS, 2009; THURECHT et al., 2006; LOEKER et al., 2004; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; SIVALINGAM et al., 2003; MEI et al. 2003; MEI et al., 2002; KOBAYASHI et al., 2000; KUMAR e GROSS, 2000; KUMAR et al., 2000).

Logo, a posse das informações experimentais citadas e/ou obtidas acima, nos remete a repensar a possibilidade de exploração do diclorometano como solvente ou cossolvente (DCM) pelo menos dentro da área de polímeros biomédicos.

4.2.1.4 - Efeito de ondas ultrassônicas nas reações de e-ROP com *cosolvente*

O uso de ondas ultrassônicas em reações de e-ROP tem ganhado destaque na última década frente aos sistemas não sonicados uma vez que o uso de ultrassom proporciona maiores conversões monoméricas (Y), menores distribuições de massa molecular (menores IP) e elevados graus de cristalinidade no polímero obtido. Além disso, as ondas ultrassônicas aumentam as velocidades de propagação polimérica e ajudam na transferência de massa de sistemas poliméricos (GUMEL et al., 2013; GUMEL et al., 2012a; GUMEL et al., 2012b; SUSLICK e PRICE, 1999).

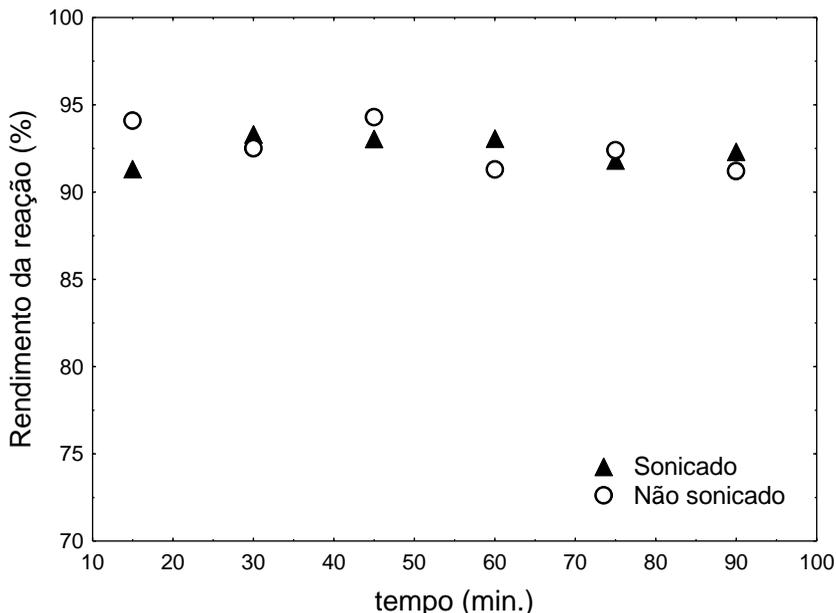
Os efeitos químicos do ultrassom derivam principalmente de cavitação acústica. O colapso da bolha em líquidos resulta em uma concentração enorme de energia a partir da conversão da energia cinética do movimento de líquido para aquecimento do conteúdo da bolha. As altas temperaturas e pressões locais, em combinação com o resfriamento extremamente rápido, fornecem um meio único para a condução de reações químicas sob condições extremas. Isso explica a diversidade de aplicações do ultrassom para aumentar a cinética química em importantes áreas da química sintética de materiais (SUSLICK e PRICE, 1999).

Neste contexto, testes preliminares foram realizados visando estabelecer a viabilidade do uso de ondas ultrassônicas para a produção de PCL em modo contínuo através de um banho ultrassônico de ondas contínuas, isto é, sem pulsos em intervalos programados de tempo e somente com uma potência de 270 watts RMS.

As Figuras 4.35 e 4.36 e as Tabelas C.11 e C.12 apresentam uma comparação entre os valores de rendimento de reação (Y) e de M_n , respectivamente, para reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas com e sem o uso de ondas ultrassônicas. Para a obtenção dos dados experimentais desta seção (4.2.1.2), reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas sob condições experimentais fixas de 120 bar, 65 °C, razão S/MIX de 2:1 e tempos espaciais (τ) fixos de 15 min foram usadas como modelo. As condições de água inicial na enzima (0,69 %) e na MIX (0,04 %), bem como a razão mássica em MIX (ϵ -CL/DCM) de 1:1 também foram mantidas constantes para estas reações de polimerização. A reação citada acima foi usada como modelo, pois apresentou melhores resultados em experimentos anteriores (seção 4.2.1) em termos de rendimento (Y), massa molecular (M_n e M_w) e velocidade de reação.

Figura 4.35 - Efeito de ondas ultrassônicas nos rendimentos de reação (Y) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.

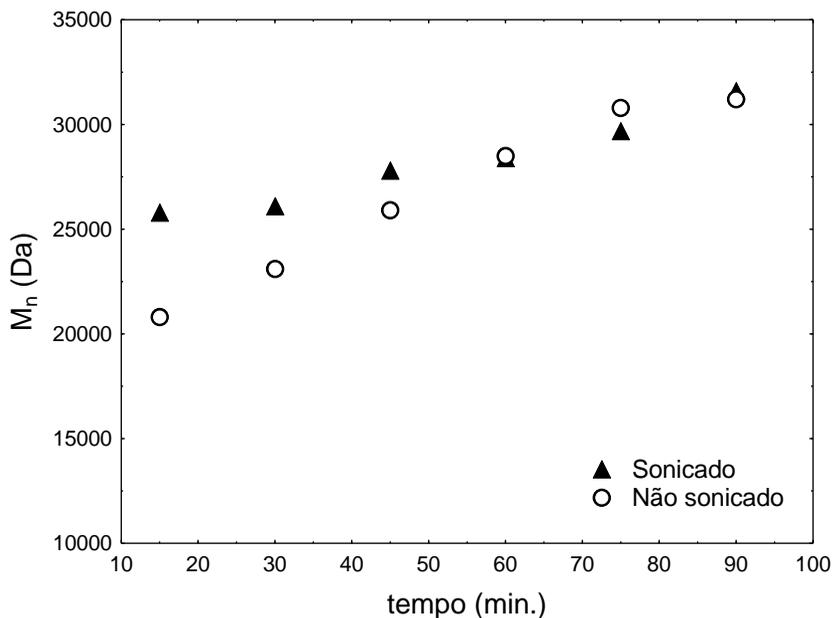


Observa-se na Figura 4.35 e Tabela C.11 que não há diferença entre o sistema sonicado e o sistema sem o uso de ultrassom para os valores de rendimento da reação (Y) e que ambos os sistemas mantêm os valores de Y praticamente constantes mesmo após 6 τ (90 min.) de reação. No entanto, para os valores de M_n (Figura 4.36 e Tabela C.12) observamos que o sistema realizado em meio reacional ultrassonicado mantém uma cinética de propagação mais constante entre os dados experimentais, o que configura uma menor oscilação nos valores de M_n entre as coletas. Este comportamento é observado durante todo o tempo de reação para uma mesma carga de enzimas (6 τ = 90 min.). Este efeito pode ser melhor analisado lançando-se mão dos valores tabelados (Tabela C.12) nos quais, para o sistema sonicado observa-se valores de M_n variando de 25800 Da (1° τ) até 31600 Da (6° τ) enquanto que para o sistema sem o uso de ultrassom os valores variaram de 20800 Da (1° τ) até 31200 Da (6° τ). Ou seja, a oscilação na massa molecular

numérica média para o sistema sonificado é de 18,4 % do 1° τ para o 6° τ , enquanto para o sistema não sonificado a oscilação é de 33,3 % para o mesmo tempo de reação (do 1° τ para o 6° τ) e mesmas condições experimentais.

Figura 4.36 - Efeito de ondas ultrassônicas nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.

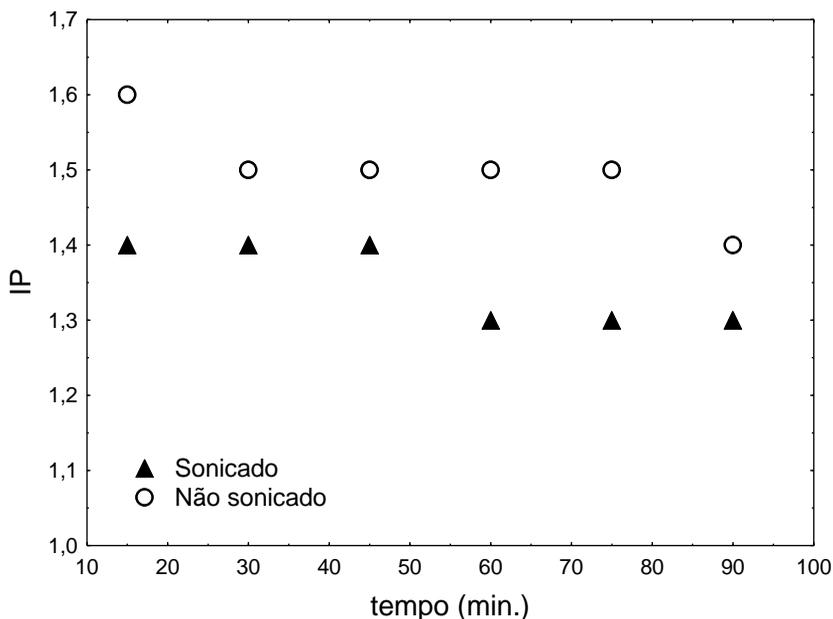


Uma maior uniformidade na distribuição das massas moleculares para o sistema realizado com ultrassom pode também ser observada nos valores de índice de polidispersão apresentados na Figura 4.37. Sabe-se que os valores de IP estão diretamente relacionados com a distribuição de tamanhos das cadeias poliméricas no produto final. Logo, os resultados apresentados pelos valores de IP sugerem uma reação de polimerização com maior controle sobre a propagação das cadeias poliméricas. A estreita faixa de distribuição de massas moleculares (baixos valores de IP) observada no presente trabalho com o uso do

ultrassom também tem sido observada na literatura para reações de e-ROP de ϵ -CL em sistemas de batelada assistidos por ultrassom (GUMEL et al., 2013; GUMEL et al., 2012a).

Figura 4.37 - Efeito de ondas ultrassônicas nos índices de polidispersão (IP) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.



Os efeitos causados pelo uso do ultrassom nos valores de M_n e IP deste trabalho também tem sido observados na literatura (GUMEL et al., 2013; GUMEL et al., 2012a; GUMEL et al., 2012b) para reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema de batelada. De acordo com tais autores as ondas ultrassônicas aumentam a velocidade de propagação das cadeias poliméricas e melhoram a transferência de massa do sistema devido ao efeito de cavitação ultrassônica, o que assegura um melhor fornecimento de monômero para a molécula de polímero em crescimento no sítio ativo da enzima desde os primeiros tempos espaciais. Isso explica a menor oscilação nos valores de M_n para o sistema assistido por ultrassom no presente trabalho.

4.2.1.5 Efeito da concentração do monômero nas reações de e-ROP com cossolvente

Diferentes autores (ZHANG et al., 2012; KUNDU et al., 2011; KUMAR e GROSS, 2000; KUMAR et al., 2000) têm demonstrado que o correto controle sobre a concentração de monômero no meio reacional para e-ROPs de ϵ -CL usando solventes orgânicos (tolueno, THF, clorofórmio, éter isopropílico, isooctano e entre outros) resulta em maiores valores de Y e M_n . Neste contexto, as Figuras 4.38 e 4.39 e Tabelas C.13 e C.14 apresentam uma comparação entre os valores de rendimento de reação (Y) e de M_n respectivamente para reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em PBR com diferentes concentrações de monômero na mistura de reagentes-MIX (DCM/ ϵ -CL).

Figura 4.38 - Efeito da concentração de monômero nos rendimentos de reação (Y) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C e tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.

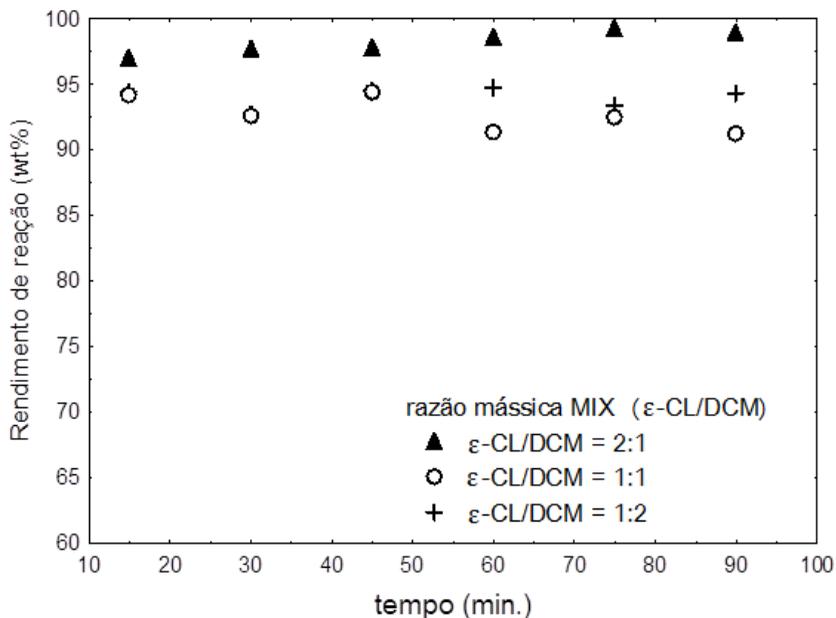
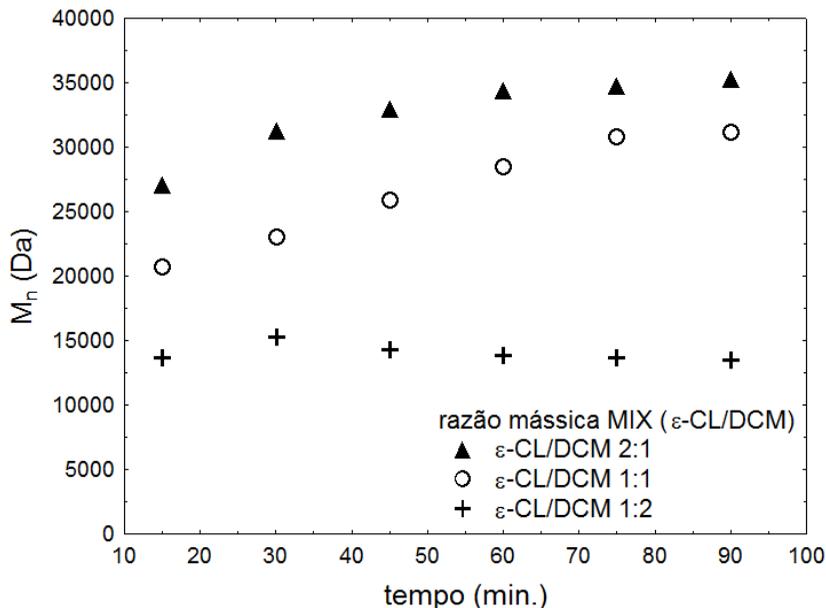


Figura 4.39 - Efeito da concentração de monômero nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

Fonte: O autor.



Cabe salientar-se que, para a obtenção dos dados experimentais desta seção (4.2.1.4), as reações de e-ROP de ϵ -CL foram realizadas sob condições experimentais fixas de 120 bar, 65 °C, razão S/MIX [(scCO₂)/(ϵ -CL+DCM)] de 2:1 e tempos espaciais (τ) fixos de 15 min. As condições de água inicial na enzima (0,69 %) e na MIX (0,04 %), bem como o DCM como cossolvente também foram mantidas constantes para estas reações de polimerização. Ainda, os sistemas apresentados nesta seção foram realizados sem o uso de ultrassom.

Observa-se nas Tabelas C.13 e C.14 e nas Figuras 4.38 e 4.39 desta seção que, a maior concentração de monômero no meio reacional promove uma melhora significativa nos valores de rendimento de reação (Y) e M_n obtidos. Neste sentido, concentrações de ϵ -CL em relação ao cossolvente (DCM) em MIX na proporção de 2:1 (ϵ -CL:DCM) resultam em valores de Y de até 98,9 % após o 6° tempo espacial (90 min.), enquanto que para concentrações de ϵ -CL na proporção de 1:2 e 1:1 em

MIX (ϵ -CL:DCM) resultam em valores de Y de, 94,2 (%) e 91,2 (%) respectivamente após o 6° tempo espacial (90 min.). Para os valores de M_n a concentração de ϵ -CL no meio reacional (ϵ -CL:DCM = 2:1) produz resultados ainda melhores. Sob concentração de 2:1 para MIX (ϵ -CL:DCM) atingiu-se o valor de 35300 Da após 6° tempo espacial (90 min.), enquanto que para concentrações de ϵ -CL na proporção de 1:2 e 1:1 em MIX (ϵ -CL:DCM) resultam em valores de M_n de 13500 Da e 31200 Da respectivamente após o 6° tempo espacial.

A literatura (KUNDU et al., 2011; SIVALINGAM e MADRAS, 2004; KUMAR et al., 2000; KUMAR e GROSS, 2000) na área de e-ROP de ϵ -CL tem demonstrado uma região de diluição ótima para as reações de polimerização de cerca de 2 partes de solvente para 1 de monômero. Neste contexto, faz sentido maiores concentrações de ϵ -CL em MIX apresentarem melhores resultados, pois os sistemas realizados nesta seção já estão diluídos no scCO₂ em proporção mássica de (scCO₂/MIX) 2:1.

Os resultados desta seção sugerem ainda que, quanto menor a quantidade de cossolvente no sistema (scCO₂ + ϵ -CL + cossolvente) melhores os resultados de Y e M_n obtidos. Cabe ressaltar ainda que, tais sistemas foram realizados sem o uso de ultrassom e, portanto, melhores resultados podem ainda ser obtidos pelo uso do ultrassom nestes sistemas menos diluídos em cossolvente. No entanto, há de se destacar que, para estes sistemas as perdas de carga no sistema aumentaram gradativamente com o aumento na concentração de ϵ -CL no meio reacional. De forma que, observaram-se perdas de carga de 30 bar, 25 bar e 15 bar respectivamente para as reações de e-ROP realizadas com proporções mássicas em MIX (ϵ -CL/DCM) de 2:1, 1:1 e 1:2 respectivamente. Neste contexto, observou-se experimentalmente em resultados obtidos anteriormente (ver seção 4.1) para polimerizações de ϵ -CL em modo contínuo sem o uso de cossolventes que perdas de carga acima de 35 bar podem levar a perda dos experimentos por travamento do reator (possível precipitação de polímero no meio).

4.2.2 Reações de e-ROP realizadas com n-butano na presença de cossolvente

Apesar de o CO₂ ser o fluido comprimido mais utilizado como solvente em reações de polimerização enzimática de ϵ -CL atualmente (ROSSO COMIM et al. 2013; SANTOS et al. 2012; THURECHT et al. 2006; LOEKER et al. 2004), outros fluidos pressurizados podem ser

utilizados, inclusive gerando ganhos expressivos de atividade enzimática no meio reacional. Dentre estes se destacam o propano e o butano por resultarem em ganho substancial de atividade enzimática para a lipase Novozym 435 (OLIVEIRA et al., 2006). Mais recentemente, Rosso Comim et al. (2013) demonstraram a eficácia do uso de gás liquefeito de petróleo – GLP como solvente na polimerização enzimática de ϵ -CL em sistema de batelada. Sabe-se que o GLP é formado por uma mistura de gases, tendo como componentes majoritários o propano e o butano em proporções de 40% a 60% v/v (propano) e 40% a 60% v/v (n-butano) respectivamente, além de demais gases em menor proporção como, etano, pentano e outros hidrocarbonetos (ROSSO COMIM, 2013). Desta forma, o estudo do uso como solvente dos componentes majoritários do GLP (butano e propano) separadamente ou em diferentes proporções volumétricas (v/v) em reações de e-ROP de ϵ -CL merece atenção. Variações na proporção destes constituintes (propano e butano) podem ocorrer durante o envase do GLP e mesmo sendo pequenas, estas variações podem resultar em produtos (polímeros) com diferentes propriedades finais. Além disso, o uso destes fluidos puros pode nos fornecer elementos para uma melhor compreensão e otimização do processo de produção de ϵ -CL em sistemas de batelada e contínuo.

Neste contexto, a tabela C.15 apresenta os resultados experimentais de Y , M_n e IP obtidos para reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema contínuo realizadas com n-butano como solvente das reações. As Figuras 4.40 e 4.41 apresentam ainda uma comparação entre os valores de rendimento de reação (Y) e de M_n , respectivamente, obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em PBR usando n-butano e os dados obtidos anteriormente com $scCO_2$ como solvente nas reações. Cabe salientar que, para a obtenção dos dados experimentais com o n-butano como solvente, reações de e-ROP de ϵ -CL foram realizadas sem o uso de ultrassom e sob condições experimentais fixas de 120 bar, 65 °C, razão mássica S/MIX [(n-butano)/(ϵ -CL+DCM)] de 2:1 e tempos espaciais (τ) fixos de 15 min. As condições de água inicial na enzima (0,69 %) e na MIX (0,04 %), bem como a razão mássica em MIX (ϵ -CL/DCM) de 1:1 também foram mantidas constantes para estas reações de polimerização.

Os resultados experimentais (Figuras 4.40 e 4.41) obtidos para reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo usando n-butano como solvente demonstraram uma menor eficiência na conversão monomérica e na propagação das cadeias poliméricas do que com o uso de $scCO_2$. O uso de n-butano como solvente resultou em rendimentos de reação (Y)

de 80,8 % para os primeiros 6 tempos espaciais (90 min.) de reagentes processados enquanto que para o scCO_2 sob mesmas condições experimentais observou-se um rendimento médio (Y) de 92,6 %.

Uma média de valores para M_n não seria representativa para o conjunto de dados obtidos (Figura 4.41), logo, uma melhor comparação destes pode ser obtida ponto a ponto. Neste caso, observa-se uma redução de 33,2 % no valor de M_n (20800 para 13900) para o 1° τ de processo ao compararmos os resultados obtidos com n-butano em relação aos obtidos com scCO_2 . Após o 6° τ de processo a redução nos valores de M_n (31200 para 25400) é de 18,6 %. Cabe lembrar que os resultados experimentais obtidos com n-butano foram realizados sob mesmas condições de pressão, temperatura, tempo espacial (τ) e razão mássica S/MIX usados para as reações de e-ROP realizadas com scCO_2 como solvente.

Figura 4.40 - Comparação entre valores de rendimento de reação (Y) obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo para n-butano e scCO_2 como solventes.

Fonte: O autor.

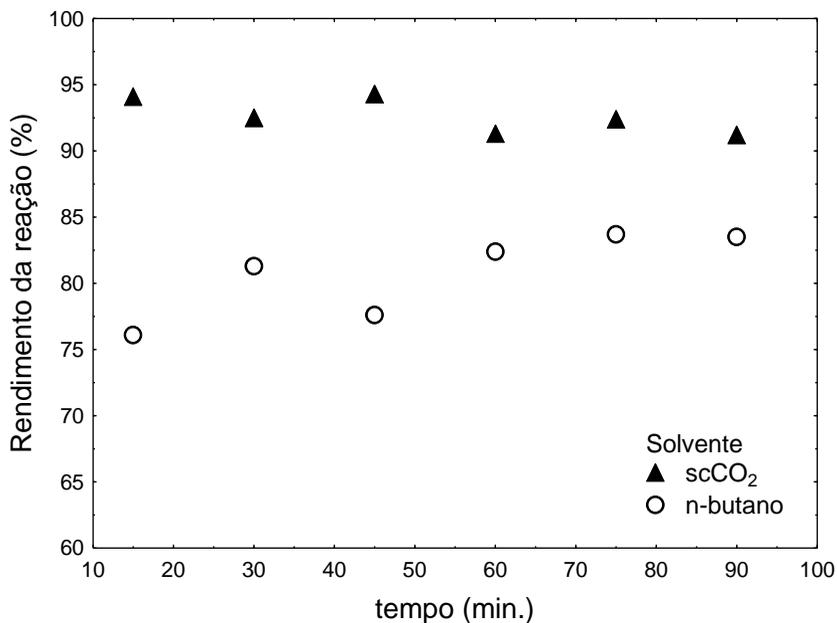
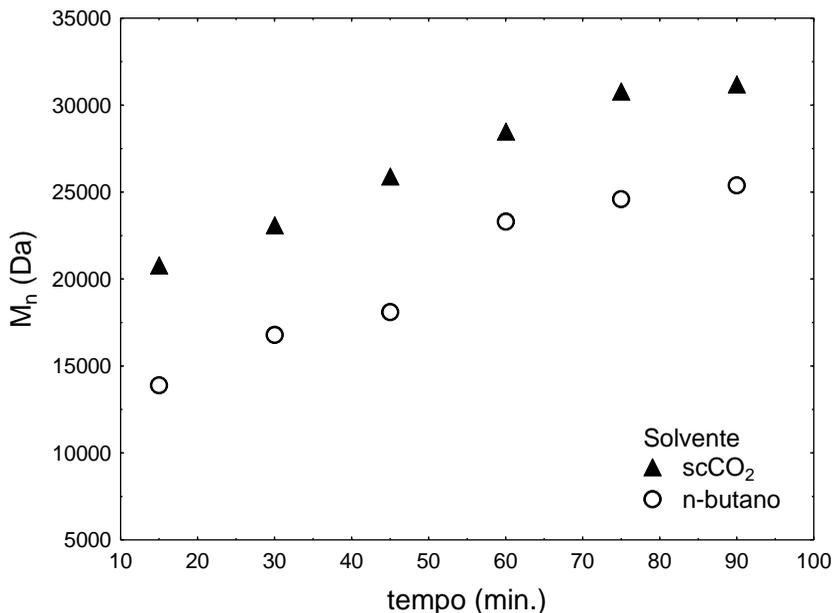


Figura 4.41 - Comparação entre valores de M_n obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo para n-butano e $scCO_2$ como solventes.

Fonte: O autor.



Neste contexto, cabe ressaltar que as diferenças de compressibilidade entre os solventes utilizados (CO_2 e n-butano) geram diferenças significativas nas densidades destes fluidos sob mesmas condições de trabalho. Por exemplo, a temperatura e pressão fixas de $65^\circ C$ e 120 bar (condições de operação dos experimentos) obtêm-se densidades de $0,375 \text{ g/cm}^3$ para o CO_2 enquanto que para o n-butano a densidade obtida é de $0,581 \text{ g/cm}^3$. Além disso, para simplificação dos cálculos de tempo espacial as densidades do DCM ($1,33 \text{ g/cm}^3$) e da ϵ -CL ($1,03 \text{ g/cm}^3$) foram assumidas como constantes para todos os experimentos. Neste sentido, mantendo-se constantes a pressão, temperatura, razões mássicas (S/MIX) e volume do reator, obtêm-se menores fluxos volumétricos de n-butano em relação ao $scCO_2$ (LAUDANI et al., 2007). Desta forma, objetivando-se manter as razões mássicas (S/MIX) e o tempo espacial (15 min.) de processamento dos reagentes foi necessário aumentar o fluxo de solvente e da mistura de reagentes (MIX) na entrada do PBR, quando foi usado o n-butano como

solvente. Portanto, maiores volumes de reagentes são processados pelas enzimas quando no uso do n-butano como solvente em lugar do scCO₂ para estes experimentos. Por exemplo, com o uso de scCO₂, 1,24 mL de reagentes (ϵ -CL+DCM) foram processados para cada tempo espacial, enquanto que com o uso de n-butano foram processados 1,77 mL de reagentes (ϵ -CL+DCM) para o mesmo tempo. Os volumes citados acima (1,24 e 1,77 mL) são os volumes de MIX bombeados (pela bomba HPLP) a cada tempo espacial de 15 min. visando manter constantes a pressão e razão mássica (S/MIX) do sistema. Isso implica uma diminuição na razão mássica de enzimas/substrato no meio reacional. Neste contexto, é dado como consenso na literatura (ROSSO COMIM et al., 2013; KUNDU et al., 2012; LOEKER et al., 2004) que diminuições nesta razão (massa de enzimas/massa de substrato) resultam em menores valores de rendimento das reações (Y) e massas moleculares (M_n e M_w) para as reações de e-ROP de ϵ -CL.

Além disso, Rosa et al. (2009) demonstraram experimentalmente que, para a produção enzimática (lipase Novosym 435) de ésteres de ácido graxo a partir do óleo de soja em fluidos comprimidos, o uso de propano em detrimento do n-butano promove um aumento significativo nos rendimentos de reação (de 10 % para 50 %). Logo, o aumento nos valores de rendimento de reação (Y) e massas moleculares (M_n e M_w) observados por Rosso Comim et al. (2013) em seu trabalho ao usar o GLP em detrimento do scCO₂ pode ser devido às propriedades do propano ou de propriedades emergentes da mistura dos gases presentes no GLP (propano, butano, etano, pentano e etc.).

4.2.3 Considerações sobre as reações de e-ROP com o uso de cossolvente

Os maiores problemas enfrentados na produção de PCL em modo contínuo sem cossolvente (seção 4.1) foram a perda de carga excessiva ao longo do reator e o acúmulo de material sobre as enzimas. Estes problemas acarretaram em perda de alguns experimentos pelo entupimento do reator, quando tempos espaciais mais longos que os apresentados na seção (4.1) foram testados, e o acúmulo de material sobre as enzimas, que resultou em diminuições bruscas nos valores de rendimento de reação (Y) e das massas moleculares (M_n e M_w) dos polímeros formados.

Neste contexto, o uso de DCM como cossolvente nas reações de e-ROP em modo contínuo mostrou-se hábil para sanar alguns destes

problemas, como diminuição da perda de carga e diminuição ou eliminação do material acumulado ou adsorvido sobre as enzimas. Isso permitiu que fossem obtidas maiores conversões monoméricas, bem como uma menor oscilação nos valores destas conversões com o passar de até 6 tempos espaciais. Além disso, menores distribuições de massas moleculares foram observadas, o que gerou menores valores de IP para todas as condições testadas. No entanto os valores de M_n foram um pouco menores que os obtidos anteriormente seção (4.1). Desta forma, com o objetivo de obter maiores massas moleculares, bem como uma menor oscilação destas com o processamento contínuo dos reagentes, diversas variáveis foram testadas a fim de aumentar a eficiência na produção de PCL em sistema contínuo. Algumas destas variáveis testadas demonstraram-se ferramentas eficientes na busca pelas melhores condições de produção de PCL em modo contínuo aumentando consideravelmente os valores de Y e M_n para reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em modo contínuo.

Neste sentido, as melhores condições experimentais observadas no decorrer da seção (4.2) para a produção de PCL em modo contínuo com o uso de cossolvente foram sumarizadas logo abaixo.

- I. O uso de DCM (diclorometano) como cossolvente nas reações de e-ROP demonstrou-se eficiente para atingir altos valores de rendimento de reação (Y) e de massas moleculares (M_n e M_w), bem como, baixos valores de polidispersão ($IP = \sim 1,5$);
- II. A busca pelo melhor cossolvente nas reações de polimerização evidenciou que o DCM (em relação ao tolueno e THF) permitiu a obtenção de polímeros com propriedades mais atrativas tanto do ponto de vista quantitativo quanto qualitativo (maiores valores de Y e de M_n);
- III. O controle sobre a quantidade de água inserida no meio reacional foi evidenciado como um dos parâmetros mais importantes na busca por altas massas moleculares e constância destes valores com o processamento contínuo dos reagentes (por até 6 τ). Neste sentido as melhores condições de água testadas foram de 0,69 (%) para a enzima e 0,04 (%) para as misturas de reagentes (MIX);
- IV. O uso de ondas ultrassônicas nas reações de e-ROP resultou em maior uniformidade e constância nos valores de Y e M_n , bem como menores valores de IP (variando de 1,3 a 1,4) dos produtos poliméricos obtidos durante todo o tempo de processamento dos reagentes (6 τ);

- V. O estudo do efeito da concentração de monômero na mistura de reagentes (MIX) variando de 2:1 (ϵ -CL/DCM) até 1:2 (ϵ -CL/DCM) evidenciou que maiores concentrações de monômero (ϵ -CL) resultaram em maiores rendimentos de reação (Y) e massas moleculares (M_n e M_w);
- VI. Testes iniciais em relação ao tipo de fluido pressurizado (CO_2 ou n-butano) a ser utilizado como solvente nas reações de e-ROP indicaram o uso de scCO_2 como o melhor solvente.

4.3 PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA PARA LONGOS PERÍODOS DE TEMPO EM CONDIÇÕES OTIMIZADAS.

Essa etapa do presente trabalho teve por objetivo a produção de PCL para longos períodos de tempo de reação com a mesma carga de enzimas e sob condições otimizadas de reação visando fornecer informações sobre a viabilidade técnica da enzima Novozyn 435 para uso em reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema contínuo através de seu reuso por diversos ciclos (prolongados tempos de uso da mesma carga de enzimas no PBR). Para tanto, o ponto de partida para a escolha das condições experimentais adotadas nesta seção foram os dados experimentais obtidos na seção 4.2, onde, as melhores condições experimentais observadas são sumarizadas na seção 4.2.3. Neste contexto as reações iniciais de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo desta seção foram realizadas a 120 bar, 65 °C e razões mássicas S/MIX (scCO_2 /mistura de reagentes) de 2:1 (66,7 % de CO_2 + 33,3 % de MIX) para sistemas assistidos por ultrassom com tempos espaciais fixos (τ) de 15 minutos e razão mássica de ϵ -CL/DCM em MIX de 2:1 (66,7 % de ϵ -CL + 33,3 % de DCM). Ainda, as quantidades de água na enzima e na mistura de reagentes (MIX) foram de 0,69 % e 0,04 % respectivamente.

No entanto, observaram-se perdas de carga acima de 50 bar ao longo do reator quando as condições experimentais adotadas acima foram usadas nas reações de polimerização e após 2 tempos espaciais ($2\tau = 30$ minutos) de reação ocorreram entupimentos do reator PBR, resultando na perda dos experimentos para duas tentativas experimentais realizadas. Além disso, grande parte do material polimérico coletado antes do entupimento do reator estava na forma sólida, o que pode ter ocorrido devido à diminuição do poder de solvatação do CO_2 no meio reacional resultante da expressiva perda de carga no sistema ao longo do reator PBR.

Baseado nos trabalhos de Rosso Comim et al. (2013) e Bender et al. (2010), pode-se dizer que grande parte do solvente CO₂ encontra-se na forma de vapor sob pressões abaixo de 100 bar e 65 °C para o sistema (CO₂ + PCL + ε-CL + DCM) obtido durante as reações de polimerização em PBR. Isso explica a perda no poder de solvatação do CO₂ e consequente precipitação do polímero no meio reacional, o que resultou no entupimento do reator PBR.

A partir destes experimentos preliminares optou-se pelo aumento da pressão para 200 bar, visando compensar a perda de carga no sistema ao longo do reator e diminuir a quantidade de CO₂ na fase vapor, resultando assim, em um aumento no poder de solvatação do CO₂ (devido ao aumento na densidade do CO₂ no meio) e possível eliminação/diminuição de polímero precipitado no meio reacional.

Desta forma, a Tabela 4.4 e Figura 4.42 apresentam os resultados experimentais para Y e M_n obtidos para reações de e-ROP de ε-CL realizadas em sistema contínuo para prolongados períodos de tempo de reação com a mesma carga de enzimas. As condições experimentais adotadas para estes experimentos foram de 200 bar, 65 °C, razão mássica de S/MIX (CO₂/MIX) de 2:1 e razão mássica de ε-CL/DCM em MIX de 2:1, para sistemas assistidos por ultrassom e com tempos espaciais fixos (τ) de 15 minutos. Cabe salientar que os resultados experimentais apresentados nesta seção foram obtidos para tempos de permanência dos reagentes dentro do PBR (tempos espaciais) de 15 minutos de reação, porém foram coletados de 60 em 60 minutos (1 hora = 4τ) de reação (forma em que os dados são apresentados na Tabela 4.4 e na Figura 4.42) visando diminuir o esforço experimental e o gasto de reagentes e filtros na purificação dos produtos poliméricos. Ainda, os resultados experimentais apresentados nesta seção são os resultados médios de uma duplicata experimental, onde os maiores desvios médios experimentais observados para os valores de Y e M_n expressos em porcentagem foram de 2,9 % e 4,8 % respectivamente. Desvios experimentais para os valores de M_n da ordem de até ~10 % são comuns na literatura para reações de e-ROP de ε-CL (KUNDU et al., 2011; THURECHT et al., 2006) devido a complexidade das reações.

Observa-se na Tabela 4.4 e Figura 4.42 que ambas as variáveis de resposta das reações Y e M_n mantêm-se constantes (não há oscilações expressivas em seus valores) por até 10 horas de reação (10 horas = 40 τ) para uma mesma carga de enzimas utilizada.

Tabela 4. 4 - Valores de Y, M_n e IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 200 bar e 65 °C para razão S/MIX (scCO₂/mistura de reagentes) de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos para razões mássicas de ϵ -CL/DCM em MIX de 2:1.

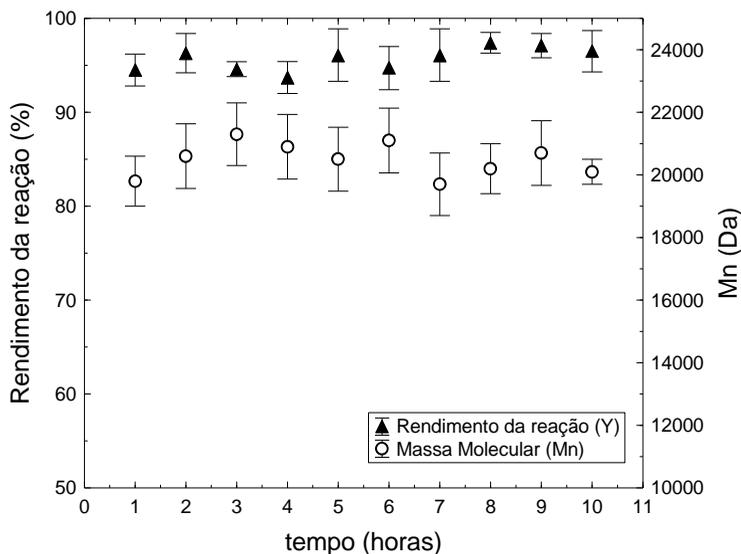
Fonte: O autor.

tempo de processamento de reagentes (horas)	scCO ₂ /MIX = 2:1		
	^a Y (%)	^a Mn (Da)	^a IP
1	94,5	19800	1,5
2	96,3	20600	1,5
3	94,6	21300	1,4
4	93,7	20900	1,5
5	96,1	20500	1,6
6	94,7	21100	1,4
7	96,1	19700	1,5
8	97,4	20200	1,5
9	97,1	20700	1,6
10	96,5	20100	1,5

^a Resultados médios oriundos de duplicatas experimentais.

Figura 4.42 - Comparação entre valores de M_n obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo para n-butano e scCO₂ como solventes.

Fonte: O autor.



Estes resultados sugerem que o método de polimerização de ϵ -CL em sistema contínuo usando a lipase Novosym 435 como biocatalizador pode ser uma alternativa promissora para produções industriais contínuas de PCL. Observa-se ainda que altas conversões foram obtidas mantendo-se uma média de $\sim 95,0$ % de rendimento nas reações de polimerização.

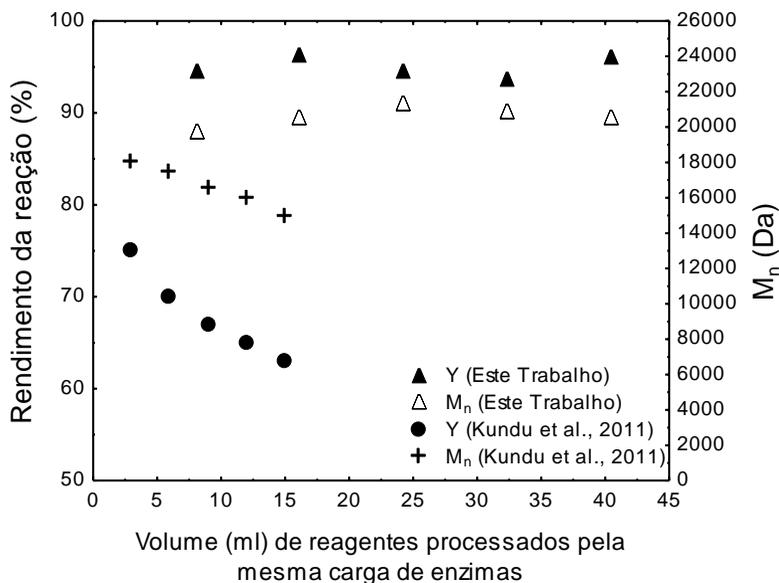
No entanto, as massas moleculares obtidas nesta seção foram menores que as obtidas nas seções anteriores (seções 4.1 e 4.2). Visando entender o porquê da diminuição nos valores de M_n para estes experimentos, foram realizadas análises de Karl Fischer dos reagentes e da enzima utilizada nesta seção. Tal procedimento foi realizado devido ao fato de a água ter mostrado ser um dos parâmetros mais importantes nas reações de e-ROP de ϵ -CL, podendo agir principalmente na diminuição das massas moleculares. Neste sentido, observou-se que o monômero usado nestes experimentos continha uma quantidade de água maior do que se desejava ter utilizado. Como mencionado na seção anterior (seção 4.2) a quantidade de água ótima definida experimentalmente foi de 0,69 % de água para a enzima, enquanto que para a mistura de reagentes (MIX) a ser escoada continuamente para dentro do PBR foi de 0,04 % de água. No entanto, através das análises de teor de água (obtidas por Karl Fischer) observou-se uma quantidade de 0,08 % de água no monômero (ϵ -CL). Cabe salientar-se que o procedimento de secagem do monômero adotado nesta seção foi o mesmo das seções anteriores, porém em virtude de otimização do tempo disponível de trabalho, a análise de Karl Fischer do monômero foi realizada somente após as reações já terem sido concluídas. Essa maior quantidade de água no monômero foi creditada a erros experimentais cometidos na etapa de secagem do monômero [devido ao grande volume de monômero seco (500 mL) para tais reações de longos tempos de reação] ou na etapa de armazenamento deste (possível umidade nos frascos onde o monômero foi armazenado).

Os resultados experimentais obtidos no presente trabalho foram ainda comparados aos dados reportados por Kundu et al. (2011) para reações de e-ROP de ϵ -CL em sistema contínuo (Figura 4.43). Cabe salientar que os dados experimentais reportados por este autor (KUNDU et al., 2011) foram obtidos em um microreator sob pressões atmosféricas e razão mássica de tolueno/ ϵ -CL de 2:1 e 70 °C usando a mesma enzima utilizada em nosso trabalho (Novosym 435). Ainda, devido ao autor (KUNDU et al., 2011) ter publicado seus resultados experimentais de Y e M_n em função do volume de reagentes processados, a Figura 4.43 foi

construída da mesma forma visando uma melhor comparação entre os dados experimentais obtidos no presente trabalho com aqueles reportados na literatura (KUNDU et al., 2011). Para tanto, desprezou-se ainda o volume de CO₂ e assumiu-se como volume de reagentes processados somente o volume de MIX (ϵ -CL/DCM) processados pelas enzimas. Neste contexto, o volume de MIX processado pelas enzimas a cada 15 min. (1 τ) é de 2,02 mL para reações a 200 bar. A diferença no volume de reagentes processados nesta seção (seção 4.3) em relação a seção anterior (seção 4.2) é devida à diferença na densidade do scCO₂ que passou de 0,375 g/cm³ (120 bar) para 0,662 g/cm³ para reações realizadas a 200 bar de pressão. Ainda, devido ao maior volume de trabalho do reator desenvolvido no presente trabalho, apenas os resultados obtidos para as primeiras 5 horas de reação (20 τ) foram plotados na Figura 4.43.

Figura 4.43 - Comparação entre valores de Y e M_n obtidos por reações de e-ROP de ϵ -CL em modo contínuo neste trabalho contra dados experimentais reportados na literatura.

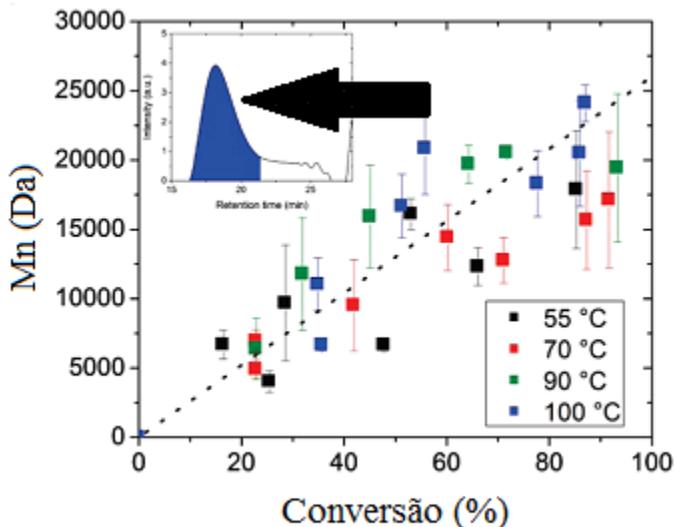
Fonte: O autor.



Observa-se na Figura 4.43 uma expressiva vantagem no uso do reator desenvolvido no presente trabalho para produção de PCL em sistema contínuo em relação ao microreator desenvolvido por Kundu et al. (2011). Isso pode ser facilmente comprovado pelos resultados experimentais de Y e M_n do presente trabalho quando comparados aos dados reportados na literatura (Figura 4.43) por Kundu et al. (2011). Além disso, maiores valores de M_n podem ser obtidos através do reator PBR desenvolvido no presente trabalho com o uso da quantidade ótima de água na mistura de reagentes-MIX (0,04 %) definida na seção anterior (seção 4.2). Esta condição pode ser mais bem explorada em estudos futuros pelo atual grupo de pesquisa na área de biopolímeros.

Cabe ressaltar ainda que, no trabalho reportado por Kundu et al. (2011) estes autores realizam ainda, lavagens com tolueno húmido (com pequenas quantidades de água não reportadas no artigo) a cada intervalo de 3 mL de reagentes processados para melhorar a performance do reator. Além disso, os autores (KUNDU et al. 2011) não reportam a massa molecular numérica média (M_n) real dos seus polímeros, pois para as análises de GPC (cromatografia de permeação em gel) os autores afirmam ter usado apenas as massas moleculares distribuídas até o ponto de inflexão do primeiro pico cromatográfico (área destacada em azul) apresentado na Figura 4.44 para a obtenção dos valores de M_n dos seus polímeros. Neste contexto, uma purificação dos polímeros de maior massa molecular seria necessária após a produção de PCL (no microreator) para atingir-se as massas moleculares reportadas por Kundu et al. (2011).

Figura 4. 44 – Forma de análise por GPC das massas moleculares apresentadas por Kundu et al., (2011).



Quanto ao índice de polidispersão (IP) obtido no presente trabalho pode-se dizer que a média de 1,5 de IP (Tabela 4.4) observada por até 10 horas de reação nos conduziu a um polímero de alta qualidade. Neste contexto, Kundu et al. (2011) não apresentam os valores de IP para seus polímeros. Pelo exposto e observado do início (seção 4.1) até a presente etapa deste trabalho pode-se dizer que o equipamento, bem como a metodologia desenvolvida para a produção de PCL em modo contínuo na presente Tese de Doutorado, além do ineditismo, mostrou-se extremamente promissora na busca por polímeros biorreabsorvíveis e biodegradáveis de alto valor agregado podendo ainda futuramente serem estes polímeros, produzidos em larga escala e com baixo custo de produção.

CAPITULO 5: CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Neste capítulo são apresentadas as conclusões decorrentes do desenvolvimento de cada etapa deste trabalho, bem como as sugestões para trabalhos futuros na área de polimerização em sistema contínuo.

5.1 CONCLUSÕES

O método experimental empregado neste trabalho mostrou-se adequado e promissor na busca por materiais poliméricos biodegradáveis e biorreabsorvíveis de alta qualidade e valor agregado.

Como parte dos objetivos desta tese uma unidade experimental para reações de polimerização a alta pressão em modo contínuo foi desenvolvida e montada no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica (LATESC) da UFSC. Este equipamento permitiu-nos o desenvolvimento de uma metodologia inédita e promissora na área de polimerização enzimática com reator de leito empacotado.

Os resultados para as reações de e-ROP de ϵ -caprolactona em sistema contínuo e meio pressurizado usando CO_2 como solvente resultaram em polímeros de alta massa molecular (M_n), porém baixas conversões (Y), altas dispersões nas massas moleculares (IP), bem como a rápida diminuição nos valores de M_n e Y com o processamento contínuo dos reagentes pelas mesmas enzimas foram observadas. Tais problemas surgiram devido a expressivas perdas de carga ao longo do PBR e ao acúmulo/adsorção de material polimérico sobre as enzimas.

Em uma segunda etapa o uso de cossolventes (DCM, THF e tolueno) nestas reações de polimerização em sistema contínuo aumentou a transferência de massa do sistema propiciando uma diminuição na perda de carga do sistema e a obtenção de altas conversões monoméricas (Y), assim como baixos valores de polidispersão dos polímeros produzidos. No entanto, massas moleculares (M_n) menores quando comparadas a etapa anterior foram obtidas. A partir destes resultados, diversas variáveis foram testadas juntamente as reações de e-ROP de ϵ -CL com cossolvente, evidenciando que o uso de DCM como cossolvente, o correto controle sobre as quantidades de água no meio reacional (0,73 % de H_2O), bem como o uso de ondas ultrassônicas em sistemas menos diluídos em cossolvente resultam em maiores rendimentos de reação (Y), massas moleculares (M_n) e menores valores de dispersão (IP) dos polímeros obtidos.

A terceira etapa deste trabalho foi realizada a partir das melhores condições experimentais obtidas anteriormente visando à polimerização de ϵ -CL por longos tempos de reação com a mesma carga de enzimas. Apesar de a quantidade ótima de água não ter sido obtida nesta etapa, foram obtidos polímeros com massas moleculares (M_n) de 20000 (Da) e conversões de 95 % em média. Além disso, a permanência na obtenção dos valores máximos de Y e M_n por até 10 horas de reação utilizando uma mesma carga de enzimas resultam na possibilidade real de uso, tanto do reator PBR como do método desenvolvido, para a produção industrial de PCL em modo contínuo.

Os dados experimentais e discussões apresentadas neste estudo contribuíram significativamente para o desenvolvimento da produção de policaprolactona por via enzimática em modo contínuo. Cabe salientar que, apesar de o presente estudo ter sido focado nas reações e-ROP de ϵ -CL, a unidade experimental desenvolvida é extensível ao estudo de inúmeros outros polímeros, bem como a ampliação de escala da mesma.

5.2 SUGESTÕES

Baseado nos desafios, dificuldades e respostas encontradas com a execução deste trabalho, bem como no fluxo de pesquisas desenvolvidas e publicadas atualmente na área de biopolímeros. Algumas sugestões para trabalhos futuros são citadas abaixo.

- a) Realizar reações de e-ROP de ϵ -CL em reatores PBR de diferentes razões H/D (comprimento/diâmetro) visando uma diminuição na perda de carga do sistema e a análise de seus efeitos sob as respostas de reação (Y , M_n , M_w e IP);
- b) Explorar o uso do ultrassom com intervalos de sonicação e não sonicação (pulso ultrassônico intermitente), bem como o uso de maiores potências ultrassônicas sob as reações de polimerização com e sem cossolvente;
- c) Ampliar e aprofundar a gama de testes na busca pelos melhores solventes e cossolventes, bem como pelas melhores razões mássicas destes nas reações de e-ROP de ϵ -CL;
- d) Estudo das reações de e-ROP de diferentes monômeros de ampla aplicação na área biomédica, bem como de seus copolímeros com PCL em modo de batelada e/ou contínuo através das unidades experimentais montadas no laboratório LATESC;

Capítulo 5: Conclusões e Sugestões

- e) Realizar a simulação/modelagem matemática das reações de e-ROP visando fornecer elementos para uma melhor compreensão dos fenômenos presentes nestas reações;
- f) Realizar uma análise de custo para avaliar a viabilidade econômica do processo.
- g) Estudar a ampliação de escala da unidade experimental por estratégias práticas (aumento do volume do PBR) e numéricas (SuperPro Designer) com ferramentas já disponíveis neste grupo de pesquisa e no Laboratório LATESC;
- h) Estudar as propriedades mecânicas e químicas da policaprolactona obtida, bem como de seus possíveis copolímeros por diferentes métodos de análise, visando definir sua organização molecular, grau de cristalinidade, velocidade de degradação, tensão-deformação e etc., objetivando definir suas possíveis aplicações *in vitro* e/ou *in vivo*;
- i) Estudo do uso de métodos como equilíbrio de fases e/ou separação por membranas na busca por polímeros de maior massa molecular via eliminação dos oligômeros nos produtos poliméricos.

REFERÊNCIAS

ADLERCREUTZ, P. On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 199, p. 609-614, 1991.

AKCELRUD, L. **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**. São Paulo: Manole, 2007.

AL-AZEMI, T. F.; KONDAVETI, L.; BISHT, K. S. Solventless enantioselective ring-opening polymerization of substituted ϵ -caprolactones by enzymatic catalysis. **Macromolecules**, v. 35, n. 9, p. 3380–3386, 2002.

ALBERTSSON, A.; SRIVASTAVA, R.K. Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p. 1077–1093, 2008.

ALMEIDA, P. P. **Extração de óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.) com misturas de solventes a alta pressão**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 114p., 2006.

ALVES, S.S. **Síntese de poli(ésteres-uretanos) à base de polióis de poli(hidroxibutirato) e poli(caprolactona)**. Orientado por Maria Isabel Felisberti. Campinas, São Paulo 2008. 82p. Dissertação – Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2008.

ANDRADE, J.M. **Efeito de dióxido de carbono e propano pressurizados na atividade catalítica de D-Hidantoinase**. Orientado por Octavio Augusto Ceva Antunes. Rio de Janeiro, 2008. 85p. Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ 2008.

ANDREW, S.D.; PHIL, G.C.; MARRA, K.G. The influence of polymer blend composition on the degradation of polymer/hydroxyapatite biomaterials. **J Mater Sci: Mater Med**, v. 12, p. 673–7, 2001.

Referências

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Portaria ANP N° 297**, de 18 de novembro de 2003. Diário Oficial [da] União, Brasília, 20 nov. 2003. Disponível em: [http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_portarias_anp/portarias_anp_tec/2003/novembro/panp%20297%20-%202003.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$g=\\$x=\\$nc=8877](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_portarias_anp/portarias_anp_tec/2003/novembro/panp%20297%20-%202003.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$g=$x=$nc=8877). Acesso em: 20 de junho de 2013.

AOYAGIA, Y.; YAMASHITA, K.; DOI, Y. Thermal degradation of poly(R)-3 hydroxybutyrate, poly(ϵ -caprolactone), and poly(S)-lactide, **Polymer Degradation and Stability**, v. 76, p. 53-59, 2001.

ARTIMPLANT. **Artelon® 2013**. Disponível em: <http://www.artimplant.com/medical-professionals/>. Acesso em: 20 de junho de 2013.

ASTM Standard D883-11, "**Standard Terminology Relating to Plastics**", ASTM International, West Conshohocken, PA, 2011. Disponível em, <http://www.astm.org/>. Acesso em 20 de junho de 2013.

ATHANASIOU, K.A.; AGRAWAL, C.M.; BARBER, F.A.; BURKHART, S.S. Orthopedic Applications for PLA-PGA Biodegradable Polymers. *Arthroscopy: J. Arthr. Rel. Surgery*, v. 14, p. 726-737, 1998.

ATKINS, P. **Moléculas**. 1ª ed. São Paulo: EDUSP, 2000.
BANKOVA, M.; KUMAR, A.; IMPALLOMENI, G.; BALLISTRERI, A.; GROSS, R.A. Mass-Selective Lipase-Catalyzed Poly(ϵ -caprolactone) Transesterification Reactions. **Macromolecules**, v. 35, p. 6858-6866, 2002.

BARBANTI S.H.; ZAVAGLIA C.A.C.; DUEK E.A.R. Bioresorbable Polymers in Tissue Engineering. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 15, p. 13-21, 2005.

BAUMANN, M.G. **Plastics solid waste management – the role of source reduction, re-use, biodegradability and incineration in future**, Antec 98, Conference Proceedings, SPE, Atlanta, USA, v. 2, 1998.

BECKMAN, E.J., Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, p. 121 – 191, 2004.

BECKMAN, E.J., Supercritical and near-critical CO₂ in green chemical synthesis and processing. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, p. 121 – 191, 2004.

BENDER, J. P.; FEITEIN, M.; MAZUTTI, M. A.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Phase behaviour of the ternary system {poly(ϵ -caprolactone) + carbon dioxide + dichloromethane}. **J. Chem. Thermodynamics**, v. 42, p. 229–233, 2010.

BIOMATERIALS AND TISSUE ENGINEERING. **Centre for bioengineering, University of Canterbury**. Christchurch, New Zealand. Disponível em:
<http://www.bioengineering.canterbury.ac.nz/biomate/index.shtml>.
Acesso em: 26 de julho de 2013.

BISHT, K.S.; DENG, R.; GROSS, R.A.; KAPLAN, D.L.; SWIFT, G. Ethyl Glucoside as a Multifunctional Initiator for Enzyme-Catalyzed Regioselective Lactone Ring-Opening Polymerization. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 1363-1367, 1998.

BORDES, C.; V. FRÉVILLE, V.; E. RUFFIN, E.; MAROTE, P.; GAUVRIT, J.Y.; BRIANÇON, S.; LANTÉRI, P. Determination of poly(ϵ -caprolactone) solubility parameters: Application to solvent substitution in a microencapsulation process. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 383, p. 236–243, 2010.

BROOKS, B. W. Dynamic Behaviour of a Continuous-Flow Polymerisation Reactor. **Chemical Engineering Science**, v. 36, p. 589-593, 1981.

BRUNNER, G. **Supercritical Fluids as Solvents and Reaction Media**. Elsevier Science, 2004.

BUTSCHER, A.; BOHNER, M.; HOFMANN, S.; GAUCKLER, L.; MÜLLER, R. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. **Acta Biomaterialia**, v. 7, p. 907–920, 2011.

Referências

- CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução**. 5 ed. LTC, São Paulo, 2002.
- CANEVAROLO JR. S. V. **Técnicas de Caracterização de Polímeros**. 2 ed. São Paulo: Artliber, 2007. 448 p.
- CASTRO, M.L. **Copolímeros estatísticos biodegradáveis de ϵ -caprolactona e l-lidilactideo – Síntese, caracterização e propriedades**. 2006. 150p. Tese (Doutorado) - Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.
- CHEN, B.; MILLER, E.M.; MILLER, L.; MAIKNER, J.J.; GROSS, R.A. Effects of Macroporous Resin Size on *Candida antarctica* Lipase B Adsorption, Fraction of Active Molecules, and Catalytic Activity for Polyester Synthesis. **Langmuir**, v. 23, p. 1381-1387, 2007.
- CHEW, S.Y.; MI, R.; HOKE, A.; LEONG, K.W. The effect of the alignment of electrospun fibrous scaffolds on Schwann cell maturation. **Biomaterials**, v, 29, p. 653–661, 2008.
- COMIM ROSSO, S.R.; BIANCHIN, E.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J.V.; FERREIRA, S.R.S. Enzymatic Synthesis of Poly(ϵ -caprolactone) in Supercritical Carbon Dioxide Medium by means of a Variable-Volume View Reactor. **J. of Supercritical Fluids**, p. 1-9, 2013.
- CORDOVA, A. et al. Lipase-catalysed formation of macrocycles by ring-opening polymerisation of ϵ - caprolactone, **Polymer Papers**, v.39, 6519-6524, 1998.
- CORDOVA, A.; IVERSEN, T.; HULT, K.; MARTINELLE, M. Lipase-catalysed formation of macrocycles by ring-opening polymerisation of ϵ -caprolactone. **Polymer**, v. 39, p. 6519-6524, 1998.
- COULEMBIER, O.; DEGÉE, P.; HEDRICK, J.L.; DUBOIS, P. From controlled ringopening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: essentially poly(malic acid) derivatives. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 723-747, 2006.
- CUI, Y.; MA, X.; TANG, X.; LUO, Y. Synthesis, characterization, and thermal stability of star-shaped poly(ϵ -caprolactone) with phosphazene

core. **Eur. Polym. J.**, v. 40, p. 299-305, 2004. DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. G.; SOLDI, E V. Aplicações Sintéticas de Lipases Imobilizadas em Polímeros. **Química Nova**, v. 27, p. 623-630, 2004.

DALTON, P.D.; WOODFIELD, T.; HUTMACHER, D.W. Publisher's note: Erratum to: "SnapShot: polymer scaffolds for tissue engineering" **Biomaterials**, v. 30, p. 2421-2423, 2009.

ELOMAA, L.; TEIXEIRA, S.; HAKALA, R.; KORHONEN, H.; GRIJPMAN, D.W.; SEPPÄLÄ, J.V. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography. **Acta Biomaterialia**, v. 7, 3850-3856, 2011.

FANOVICH, M. A.; JAEGER, P. Sorption and diffusion of compressed carbon dioxide in polycaprolactone for the development of porous scaffolds. **Materials Science and Engineering C**, v. 32, p. 961-968, 2012.

FIAMETTI, K.G. **Produção enzimática de monoglicérides a partir de óleo de oliva na presença de surfactante**. 2008. 89p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, 2008.

FOGLER, H.S.; GURMEN, M.N. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. Fourth edition (2008).

FRANCESCHI, E.; DE CESARO, A. M.; FEITEN, M.; FERREIRA, S. R. S.; DARIVA, C.; KUNITA, M. H.; RUBIRA, A. F.; MUNIZ, E. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Precipitation of β -carotene and PHBV and co-precipitation from SEDS technique using supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 47, p. 259-269, 2008.

FUKUDA, H.; KONDO, A.; NODA, H. Biodiesel fuel production by transesterification of oils. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 92, p 405-416, 2001.

GEUS, M. **Enzymatic catalysis in the synthesis of new polymer architectures and materials**. Orientado por C.E. Koning. Eindhoven,

Referências

- 2007.131p. Tese (Doutorado) – Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven, Germany, 2007.
- GROSS, R.A.; KUMAR, A.; KALRA, B. Polymer Synthesis by In Vitro Enzyme Catalysis. **Chemical Reviews**, v 101, n.7, p. 2097-2124, 2001.
- GUMEL, A.M.; ANNUAR, M.S.M.; CHISTI, Y. Ultrasound-Assisted Enzymatic Synthesis of Poly- ϵ -Caprolactone: Kinetic Behavior and Reactor Design. **International Journal of Chemical Reactor Engineering**, v. 11, p. 609–617, 2013.
- GUMEL, A.M.; ANNUAR, M.S.M.; CHISTI, Y. Lipase catalyzed ultrasonic synthesis of poly-4-hydroxybutyrate-co-6-hydroxyhexanoate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 937–947, 2012.
- GUMEL, A.M.; ANNUAR, M.S.M.; CHISTI, Y.; HEIDELBERG, T. Ultrasound assisted lipase catalyzed synthesis of poly-6-hydroxyhexanoate. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 19, p. 659–667, 2012.
- HABULIN, M.; KNEZ, Z. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 1260-1266, 2001.
- HEDFORS, C.; OSTMARK, E.; MALMSTROM, E.; HULT, K.; MARTINELLE, M. Thiol End-Functionalization of Poly(ϵ -caprolactone), Catalyzed by *Candida antarctica* Lipase B. **Macromolecules**, v. 38, 2005.
- HEIDEMANN W, JESCHKEIT S, RUFFIEUX K, FISCHER JH, WAGNER M, KRUGER G. Degradation of poly(D,L)lactide implants with or without addition of calcium phosphates in vivo. **Biomaterials**, v. 22, p. 2371–81, 2001.
- HENDERSON, L.A.; SVIRKIN, Y.Y.; GROSS, R.A. Enzyme-catalyzed polymerizations of epsilon-caprolactone - effects of initiator on product structure, propagation kinetics, and mechanism. **Macromolecules**, v. 29, p. 7759-7766, 1996.
- HIKI, S.; MIYAMOTO, M.; KIMURA, Y. Synthesis and characterization of hidroxyterminated [RS]-poly(3-hydroxybutyrate)

and its utilization to copolymerization with Lactide to obtain a biodegradable thermoplastic elastomer, **Polymer**, v. 41, p. 7369-7379, 2000.

HOBBS, H.R.; THOMAS, N.R. Biocatalysis in Supercritical Fluids, in Fluorous Solvents, and under Solvent-Free Conditions, **Chemical Reviews**, v. 107, p. 2786-2820, 2007.

HOKUGO, A.; TAKAMOTO, T.; TABATA, Y. Preparation of hybrid scaffold from fibrin and biodegradable polymer fiber. **Biomaterials**, v.27, n.1, p.61-67, 2006.

IGNACHEWSKI, F.; FUJIWARA, S. T.; FERNANDO CÓTICA, L. F.; CARNEIRO, L. M.; TAUCHERT, E.; PERALTA-ZAMORA, P. Degradação de corantes reativos por processo Foto-Fenton envolvendo o uso de Peneira Molecular 4Å modificada com Fe³⁺. **Quim. Nova**, v. 33, p. 1640-1645, 2010.

IKADA, Y.; TSUJI, H. Biodegradable polyesters for medical and ecological applications. **Macromol. Rapid Commun**, v. 21, p. 117–132, 2000.

JACOBS, M.A. **Measurement and modeling of thermodynamic properties for the processing of polymers in supercritical fluids.** Orientado por J.T.F. Keurentjes e L.P.B.M. Janssen. Eindhoven, 2005. 131 f. PhD thesis (Doctored) -Eindhoven University of Technology, Eindhoven, 2005.

JÉRÔME, C.; LECOMTE P. Recent advances in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1056–1076, 2008.

JESSOP, P.G.; LEITNER, W. Supercritical fluids as media for chemical reactions, in **Chemical Synthesis Using Supercritical Fluids**, Ed por JESSOP, P.G.; LEITNER, W. Wiley- VCH, Weinheim, p 1-35, 1999.

JIA, W. T.; ALPERT, B. Root canal filling material United States Patent Application 20030113686, **US Patent & Trademark Office**, June 19, 2003.

Referências

JIA, W. T.; TROPE, M. ALPERT, B. Dental filling material United States Patent Application 20050069836, **US Patent & Trademark Office**, March 31, 2005.

JIA, W.T. Dental filling material United States Patent Application 20050066854, **US Patent & Trademark Office**, March 31, 2005.

KAIGLER, D.; MOONEY, D. Tissue engineering's impact on dentistry. **J. Dent. Educ.** v. 65, p. 456-465, 2001.

KAMAT, S.; BARRERA, J.; BECKMAN, J.; RUSSELL, A.J. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids. I: Optimization of Enzyme Environment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 158-166, 1992.

KAMAT, S.; CRITCHLEY, G.; BECKMAN, E.J.; RUSSELL, A.J. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids. III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 610, 1995.

KAO, F.J; EKHORUTOMWEN, S.A; SAWAN, S.P Residual stability of lipase from *Candida rugosa* in hexane, supercritical CO₂, and supercritical SF₆, **Biotechnol. Tech.**, v. 11, n. 12, p. 849, 1997.

KNANI, D.; GUTMAN, A. L.; KOHN, D. H.: Enzymatic polyesterification in organic media: enzyme-catalyzed synthesis of linear polyesters. 1. Condensation polymerization of linear hydroxyesters. 2. Ring-opening polymerization of epsilon-caprolactone. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 31, p. 1221-1232, 1993.

KOBAYASHI, S.; UYAMA, H.; KIMURA, S. Enzymatic polymerization **Chemical Reviews**, v. 101, n.12, p. 3793-3818, 2001.

KOBAYASHI, S.; UYAMA, H.; TAKAMOTO, T. Lipase-Catalyzed Degradation of Polyesters in Organic Solvents. A New Methodology of Polymer Recycling Using Enzyme as Catalyst. **Biomacromolecules**, v.1, p. 3-5, 2000.

KOVALEVSKY, G.; BARNHART, K.; Norplant and other implantable contraceptives. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, v. 44, p. 92-100, 2001.

KRÜGER, R. L. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva**. Orientado por Jorge Luiz Ninow. Florianópolis, 2010. 131 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2010.

KUMAR, A.; GROSS, R.A. Candida antarctica Lipase B Catalyzed Polycaprolactone Synthesis: Effects of Organic Media and Temperature. **Biomacromolecules**, v.1, p. 133-138, 2000.

KUMAR, A.; GROSS, R.A. Candida antarctica lipase B-catalyzed transesterification: New synthetic routes to copolyesters. **Journal of the American Chemical Society**, v.122, n.48, p. 11767-11770, 2000.

KUMAR, A.; KALRA, B.; DEKHTERMAN, A.; GROSS, R.A. Efficient Ring-Opening Polymerization and Copolymerization of ϵ -caprolactone and ω -Pentadecalactone Catalyzed by Candida antarctica Lipase B. **Macromolecules**, v. 33, p. 6303-6309, 2000.

KUMAR, K.; MADRAS, G.; MODAK, J. Enzymatic synthesis of ethyl palmitate in supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 43, p. 1568-1573, 2004.

KUNDU, S.; BHANGALE, A.S.; WALLACE, W.E.; FLYNN, K.M.; GUTTMAN, C.M.; GROSS, R.A.; BEERS, K.L. Continuous flow enzyme-catalyzed polymerization in a microreactor santanu kundu. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 6006–6011, 2011.

KWON, I.K.; KIDOAKI, S.; MATSUDA, T. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. **Biomaterials**, v. 26, p. 3929–3939, 2005.

Referências

- Labet, M.; Thielemans, W. Synthesis of Polycaprolactone: a review. **Supplementary Material (ESI) for Chemical Society Reviews**, p. 1-52, 2009.
- LAM, C.X.F.; MO, X.M.; TEOH, S.H.; HUTMACHER, D.W. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer. **Materials Science and Engineering**, v. 20, p. 49–56, 2002.
- LAUDANI, C.G.; HABULIN, M.; KNEZ, H.; PORTA, G.D.; REVERCHON, E. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench scale packed-bed reactor study. **J. Supercrit. Fluids**, v. 41, p. 74–81, 2007.
- LECOMTE, P.; JÉRÔME, R. **New developments in the synthesis of aliphatic polyesters by ring-opening polymerization**, in: R. Smith (Ed.), *Biodegradable Polymers for Polymer Industrial Applications*, Woodhead Publishing Ltd, p. 77–106, 2005.
- LEE, C.S.; RU, M.T.; HAAKE, M.; DORDICK, J.S.; REIMER, J.A.; CLARK, D.S. Multinuclear NMR Study of Enzyme Hydration in an Organic Solvent **Biotechnology and Bioengineering**, v. 57, p. 686-693, 1998.
- LEE, M.; DUNN, J.C.Y.; WU, B.M. Scaffold fabrication by indirect three-dimensional printing. **Biomaterials**, v. 26, p. 4281–4289, 2005.
- LI, Q.; LI, G.; YU, S.; ZHANG, Z.; MA, F.; FENG, Y. Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone catalyzed by a novel thermophilic lipase from *Fervidobacterium nodosum*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 253–257, 2011.
- LIAN, Z.; EPSTEIN, S.A.; BLENK, C.W.; SHINE, A.D. Carbon dioxide-induced melting point depression of biodegradable semicrystalline polymers. **J. of Supercritical Fluids**, v. 39, p. 107–117, 2006.
- LIN T.J., CHEN S.W., CHANG A.C. Enrichment of n-3 PUFA contents on triglycerides of fish oil by lipase catalyzed trans-esterification under supercritical conditions. **Biochemical Engineering Journal** v. 29, p.27–34, 2006.

LIQUIGAZ. **Ficha de Informações do Produto Químico (FISPQ).**

Disponível em:

<http://www.liquigas.com.br/wps/wcm/connect/a94a95004640d0be8ce7cddd2947447b/FISPQ+GLP+rev+01-11.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 22 de setembro de 2012.

LOEKER, F. C. et al. Enzyme-catalyzed ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide. **Macromolecules**, v.37, n.7, p.; 2450-2453, 2004.

LOU, X.; DETREMBLEUR, C.; JÉRÔME, R. Novel aliphatic polyesters based on functional cyclic (di)esters. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 24, p. 161–172, 2003.

LOW, S.W.; NG, Y.J.; YEO, T.T.; CHOU, N. Use of Osteoplug polycaprolactone implants as novel burr -hole covers. **Singapore Medical Journal**, v. 50, n.8, p.777-780, 2009.

LUCAS, E. F.; SOARES, B. G.; MONTEIRO, E. E. C. **Caracterização de Polímeros**. Determinação de peso molecular e análise térmica. E-papers. Rio de Janeiro, 2001.

MATSUMURA, S.; EBATA, H.; KONDO, R.; TOSHIMA, K. Organic solvent-free enzymatic transformation of poly(ϵ -caprolactone) into repolymerizable oligomers in supercritical carbon dioxide, **Macromolecular Rapid Communications**, v. 22, p. 1325–1329, 2001.

MATSUMURA, S.; EBATA, H.; TOSHIMA, K. A New Strategy for Sustainable Polymer Recycling Using an Enzyme: Poly(ϵ -caprolactone). **Macromolecular Rapid Communications**, v 21, p. 860-863, 2000.

MATSUMURA, S.; OSANAI, Y.; TOSHIMA, K. Enzymatic transformation of aliphatic polyesters into cyclic oligomers using enzyme packed column under continuous flow of supercritical carbon dioxide with toluene. **Science and Technology of Advanced Materials**, v.7, p.202-208, 2006.

MATTHIJS DE GEUS, M.; PEETERS, J.; WOLFFS, M.; HERMANS, T.; PALMANS, A.R.A.; KONING, C.E.; HEISE, A. Investigation of factors influencing the chemoenzymatic synthesis of block copolymers. **Macromolecules**, v. 38, p. 4220-4225, 2005.

Referências

- McHUGH, M.; KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extraction, Stonenham, Butterworth-Heinenamm**, 1994.
- MEI, Y.; KUMAR, A.; GROSS, R. A. Probing water-temperature relationships for lipase-catalyzed lactone ring-opening polymerizations. **Macromolecules**, v. 35, p. 5444-5448, 2002.
- MEI, Y.; KUMAR, A.; GROSS, R. A. Probing water-temperature relationships for lipase-catalyzed lactone ring-opening polymerizations. **Macromolecules**, v. 35, p. 5444-5448, 2002.
- MEI, Y.; KUMAR, A.; GROSS, R.A. Kinetics and Mechanism of *Candida antarctica* Lipase B Catalyzed Solution Polymerization of ϵ -Caprolactone. **Macromolecules**, v. 36, p. 5530–5536, 2003.
- MESIANO, A.J.; BECKMAN, E.J.; RUSSEL, A.J. **Supercritical Biocatalysis. Chemical Reviews**, v. 99, p. 623-633, 1999.
- MIDDLETON, J.C.; TIPTON, A.J. Synthetic biodegradable polymers as orthopedic. **Biomaterials**, v. 21, p. 2335-2346, 2000.
- MIKOS, A.G.; SARAkinos, G.; LYMAN, M.D. “Prevascularisation of porous biodegradable polymer”, **Biotechnology and Bioengineering**, v. 42, p. 716-23, 1993.
- MILLS, I; CVITAS, T.; KLAUS, H.; KALLAY, N.; KUCHITSU, K. **Quantities, units and symbols in physical chemistry**. IUPAC, Blackwell Science Ltda: Oxford, 1993. 2.ed., p. 166. Disponível em: http://old.iupac.org/publications/books/gbook/green_book_2ed.pdf. Acesso em: 15 mai. 2013.
- MIOLA, C.; HAMAIDE, T.; SPITZ, R. End-functionalized poly(ϵ -caprolactone) oligomers through heterogeneous catalysis in protic conditions: a mechanistic approach. **Polymer**, v. 38, p. 5667-5676, 1997.
- MONHEMI, H.; HOUSAINDOKHT, M.R. How enzymes can remain active and stable in a compressed gas? New insights into the conformational stability of *Candida antarctica* lipase B in near-critical propane. **J. of Supercritical Fluids**, v. 72, p. 161–16, 2012.

MORRISON, R.; BOYD, R. **Química orgânica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 13.ed. p. 1510p, 1996.

NAING, M.W. et al. Fabrication of customised scaffolds using computer-aided design and rapid prototyping techniques. **Rapid Prototyping Journal**, v. 11, n.4, p.249-259, 2005.

NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. **Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery**. In: Lee K, Kaplan D, editors. Tissue engineering I. Advances in biochemical engineering/biotechnology. Berlin: Springer Verlag Review Series; p. 47–90, 2006.

NAIR, L.S., LAURENCIN, C.T. Biodegradable polymers as biomaterials. **Progress in Polymer Science**, v.32, p. 762–798, 2007.

NAKAMURA, K. Biochemical reactions in supercritical fluids. **Trends in Biotechnology** v. 8, p. 288–92, 1990.

NAKAOKI, T.; KITO, H.; GROSS, R. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical CO₂, **Polymer Biocatalysis and Biomaterials**, v. 27, p. 393–404, 2005.

NIST. National Institute of Standards and Technology. Chemistry Webbook. **Thermophysical Properties of Fluid Systems**. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/fluid/>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A.F.; KUNITA, M.H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p.373–382, 2006.

OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO₂. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39 ,p. 4450-4454, 2000.

PACHENCE, J.M.; BOHRER, M.P.; KOHN, J. **Biodegradable Polymers. Principles of Tissue Engineering**. 3 ed., p. 323–39, 2007.

Referências

- PAQUES, F.W.; MACEDO, G.A. Lipases de Látex vegetal: propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v.29, p. 93-99, 2006.
- PENCZEK, S.; CYPRYK, M.; DUDA, A.; KUBISA, P.; SLOMKOWSKI, S. Living ring opening polymerizations of heterocyclic monomers, **Prog. Polym. Sci.**, v. 32, p. 247–282, 2007.
- PEREIRA, C. G. **Obtenção de extratos de leiteira de dois irmãos (Tabernaemontana catharinensis A.D.C.), cidrão (Aloysia triphylla L’Hérit. Britton) e manga (Mangifera indica L.) por extração supercrítica: estudo dos parâmetros de processo, caracterização e atividade antioxidante dos extratos**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, 225 p., 2005.
- PETROBRÁS. **Seminário sobre Gás**. Disponível em: http://www.petrobras.com.br/minisite/premiotecnologia/pdf/Tecnologia_Gas_Seminario_GAS.pdf. Acesso em: 03 de outubro de 2012.
- PITT, C.G.; MARKS, T.A.; SCHINDLER, A. in: R. Baker (Ed.), **Controlled Drug Release of Bioactive Materials**, Academic Press, New York, 1980.
- PLASTVIDA. “**Monitoramento dos Índices de Reciclagem Mecânica de Plástico no Brasil (IRmP) 2011**”, p. 1-28, 2012.
- PRIAMO, W.L.; CEZARO, A.M.; FERREIRA, S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Precipitation and encapsulation of β -carotene in PHBV using carbon dioxide as anti-solvent. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 54, p. 103–109, 2010.
- PUBLIC HEALTH GOALS FOR CHEMICALS IN DRINKING WATER. **Public Health Goal for Dichloromethane (METHYLENE CHLORIDE, DCM) In Drinking Water**, p. 1-159, 2000.
- QUEIROZ, A.A.A.; FRANÇA, E.J.; ABRAHAM, G.A.; ROMAN, J.S. Ring Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone by Iodine Charge-Transfer Complex. **J. Polym. Sci.**, v. 40, p. 714-722, 2002.

RATNER, B.D. “**Novel polymers for esophageal tissue engineering**”, Proceedings of International Conference for Epithelial Tissue Engineering, Singapore. 2003.

REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 3413–3431, 2006.

REZWAN, K.; CHEN, Q.Z.; BLAKER, J.J.; BOCCACCINI, A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. **Biomaterials**, v. 27, p. 3413–3431, 2006.

ROSA, C.D.; MORANDIM, M.B.; NINOW, J.L.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, J.V. Continuous lipase-catalyzed production of fatty acid ethyl esters from soybean oil in compressed fluids. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 5818–5826, 2009.

ROSSO COMIM, S.R. **Produção Enzimática de Poli(ε-Caprolactona) em Fluidos Pressurizados**. Orientado por Sandra R. S. Ferreira. Florianópolis, 2013. 240 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Florianópolis, 2013.

SANGSANO, P., WALEETORN, C., CHEEPSAWAT, S., SUWANTONG, O., WUTTICHAROENMONGKOL, P., WEERANANTANAPAN, O., CHUENJITBUNTAWORN, B., CHEEPSUNTHORN, P., PAVASANT, P. E SUPAPHOL, P. In Vitro Biocompatibility of Schwann Cells on Surfaces of Biocompatible Polymeric Electrospun Fibrous and Solution-Cast Film Scaffolds. **Biomacromolecules**, v. 8, p. 1587–1594, 2007.

SANTOS, R.D.; ROSSO COMIM, S.R.; OLIVEIRA, D.; TREICHEL, H.; DI LUCCIO, M.; FERREIRA S.R.S.; OLIVEIRA, J.V. Lipase-catalyzed synthesis of poly(ε-caprolactone) in supercritical carbon dioxide. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 1, p. 280–283, 2012.

Referências

SCHULZE, B.; WUBBOLTS, M.G. Biocatalysis for industrial production of fine chemicals. **Current Opinion in Biotechnology**, v.10, n.6, p. 609-615, 1999.

SCHWACH, G.; COUDANE, J.; ENGEL, R.; VERT, M. Zn lactate as initiator of DL-lactide ring opening polymerization and comparison with Sn octoate, **Polym. Bull. (Berlin)**, v, 37, p. 771–776, 1996.

SINHA, V.R.; BANSAL, K.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R.; TREHAN. A. Poly- ϵ -caprolactone microspheres and nanospheres: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 278, p. 1–23, 2004.

SIVALINGAM, G.; CHATTOPADHYAY, S.; MADRAS, G. Solvent effects on the lipase catalyzed biodegradation of poly (ϵ -caprolactone) in solution. **Polymer Degradation and Stability**, v. 79, p.413-418, 2003.

SIVALINGAM, G.; MADRAS, G. Modeling of lipase catalyzed ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone. **Biomacromolecules**, v.5, p. 603–609, 2004.

STEVENS, M. P. **Polymer Chemistry**: An introduction, Oxford University Press, New York, 1999.

STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: Current state and prospects. **Annual Review of Medicine** , v.52, p. 443-451, 2001.

STRELITZKI, R.; REED, W.F. Automated batch characterization of polymer solutions by light scattering and viscosimetry. **J. Applied Polymer Science**, v. 73, p. 2359-2368, 1999.

TAI, H.; POPOV, V.K.; SHAKESHEFF, K.M.; HOWDLE, S.M. Putting the fizz into chemistry: applications of supercritical carbon dioxide in tissue engineering, drug delivery and synthesis of novel block copolymers, **Biochemical Society Transactions**, v.35, p. 516–521, 2007.

TAKAMOTO, T.; UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Lipase-catalyzed degradation of polyester in supercritical carbon dioxide. **Macromolecular Bioscience.**, v.1, p. 215–218, 2001.

- THURECHT, K. et al. Kinetics of enzymatic ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide. **Macromolecules**, v. 39, p. 7967–7972, 2006.
- TIENEN, V.T.G.; HEIKANTS, R.; BUMA, P. “Tissue ingrowth and degradation of two biodegradable porous polymers with different porosities and pore sizes”. **Biomaterials**, v. 23, p. 1731-8, 2002.
- TORTOSA, K et al. Homogeneous and heterogeneous polymerization of ϵ -caprolactone by neodymium alkoxides prepared in situ. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 202, p. 1156-1160, 2001.
- UPPENBERG, J.; HANSEN, M.T.; PATKAR, S.; JONES, T.A. The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*, **Structure**, v. 2, 293–308, 1994.
- UYAMA, H.; KOBAYASHI, S. Enzymatic ring-opening polymerization of lactones catalyzed by lipase. **Chemistry Letters.**, p. 1149-1150, 1993.
- UYAMA, H.; SUDA, S.; KOBAYASHI, S. Enzymatic Synthesis of Terminal-Functionalized Polyesters by Initiator Method. **Acta Polymerica**. v. 49, n.12, p. 700-703, 1998.
- UYAMA, H.; TAKEYA, K.; HOSHI, N.; KOBAYASHI, S. Lipase-catalyzed ring-opening polymerization of 12-dodecanolide. **Macromolecules**, v. 28, n. 21, p. 7046–7050, 1995.
- VAN NATTA, F.J.; HILL, J.W.; CARRUTHERS, W.H. Polymerization and ring formation, ϵ -caprolactone and its polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v.56, p.455–459, 1934.
- VARMA, I.K.; ALBERTSSON, A.C.; RAJKHOWA, R.; SRIVASTAVA, R.H. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. **Progress in Polymer Science**, v. 30, p. 949-981, 2005.
- VERT, M. Degradable and bioresorbable polymers in surgery and in pharmacology: beliefs and facts. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 20, p.437–446, 2009.

Referências

- VERT, M.; LI, M.S.; SPENLEHAUER, G.; GUERIN, P. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v.3, p.432–446, 1992.
- WOODRUFF, M.A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, v. 35, p.1217–1256, 2010.
- XIE, J.; WILLERTH, S.M.; LI, X.; MACEWAN, M. R.; RADER, A.; SAKIYAMA-ELBERT, S.E.; XIA, Y. The differentiation of embryonic stem cells seeded on electrospun nanofibers into neural lineages. *Biomaterials*, v. 30, p. 354–362, 2009.
- YAMASHITA, M et al. Organolanthanide-initiated living polymerizations of ϵ -caprolactone, δ -valerolactone, and β -propiolactone. *Macromolecules*, v. 29, p. 1798-1806, 1996.
- YANG, F.; MURUGAN, R.; WANG, S.; RAMAKRISHNA, S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials*, v. 26, p. 2603–2610, 2005.
- ZAKS, A.; KLIBANOV, A. M. The effect of water on enzyme action in organic media. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 263, p. 8017–8021, 1988.
- ZHANG, M.; RAY, W.H. Modeling of Living Free-Radical Polymerization Processes. I. Batch, Semibatch, and Continuous Tank Reactors. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 86,p. 1630-1662, 2002.
- ZHANG, M.J.; SU, E.Z.; LIN, J.P.; WEI, D.Z. Lipase-catalyzed Continuous Ring-opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in a Packed-bed Reactor. *Chem. Biochem. Eng. Q.*, v. 26, p. 1–6, 2012.

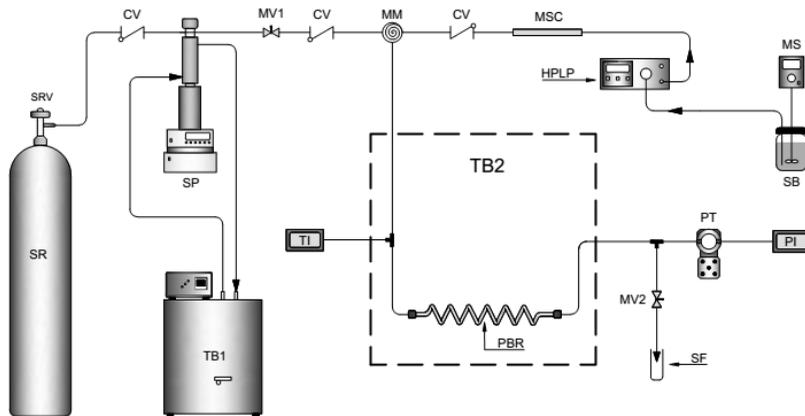
APÊNDICE A – PROJETO E CONSTRUÇÃO DO EQUIPAMENTO USADO PARA PRODUÇÃO DE POLICAPROLACTONA EM MODO CONTÍNUO

A.1 - UNIDADE DE POLIMERIZAÇÃO EM MODO CONTÍNUO E SEUS COMPONENTES

A unidade de Polimerização em sistema contínuo para altas pressões desenvolvida no presente trabalho (Figura A.1) foi elaborada a partir das unidades experimentais apresentadas por Rosa et al., (2009) e Laudani et al., (2007) com algumas modificações e adaptações necessárias para a produção polimérica. Esta unidade foi projetada e montada de forma a possibilitar/facilitar sua manutenção/modificação, manuseio experimental e/ou ampliação de escala da mesma. Para isso, a unidade foi desenvolvida a partir de equipamentos como, bombas e equipamentos/dispositivos de medida e auxiliares, bem como tubulações e conexões comerciais de fácil aquisição, os quais são apresentados na Tabela (A.1) juntamente com suas faixas máximas de trabalho/segurança e seus respectivos fornecedores e/ou marcas. A finalidade de cada equipamento ou dispositivo é descrita no texto abaixo. Já a metodologia experimental de funcionamento da unidade foi apresentada na seção (3.2).

Apêndice A

Figura A.1 – Aparato Experimental para polimerização de ϵ -caprolactona em modo Contínuo, legenda: SR – reservatório de solvente, TB1 – banho termostático, TB2 – banho ultrassônico, SP – bomba seringa, HPLP – bomba de alta pressão de líquidos, TI – indicador de temperatura, PBR – reator empacotado com enzimas, PT – transdutor de pressão, PI – indicador de pressão, MS – agitador mecânico, SB – recipiente com substrato, SF – fraco coletor de amostra, MSC – coluna de peneiras moleculares, MM – micromisturador, CV – *check valve*, válvula de via única, MV – válvula agulha.



A unidade experimental apresentada na Figura (A.1) consiste dos seguintes itens:

SR) Reservatório de solvente;

SRV) Válvula abre fecha acoplada ao próprio reservatório de solvente;

CV) Válvula de Via Única, essa válvula tem a função de permitir o fluxo em apenas um sentido. É inserida entre o cilindro de solvente e a bomba **SP** com o intuito de evitar que pressões elevadas (pressão do experimento) sejam aplicadas na cabeça do cilindro de CO_2 . As demais válvulas **CV** são utilizadas a fim de evitar o retorno de algum dos componentes (reagentes) para a bomba de origem;

MV1) Válvula micrométrica tipo agulha, usada com a finalidade de controlar o fluxo de solvente e ajudar a manter a pressão constante dentro do reator (**PBR**);

MV2) Válvula micrométrica tipo agulha, usada com a finalidade de controlar o fluxo de saída do produto da reação (polímero) e manter a pressão constante dentro do reator (**PBR**). Como o solvente comprimido

(ex. CO₂) expande após esta válvula e conseqüentemente a congela devido ao efeito Joule-Thomson ser pronunciado, há a necessidade de um sistema de aquecimento para permitir a manutenção do fluxo constante. Para tal, o corpo da válvula **MV2** é mantido submerso no banho **TB2**. Outra forma de aquecimento para a válvula poderia ser pelo auxílio de uma fita de aquecimento;

SP) Bomba seringa de alta pressão com reservatório cilíndrico encamisado, o que possibilita o controle da temperatura do fluido contido dentro do reservatório da bomba em um valor pré-determinado com auxílio do banho de recirculação (**TB1**). Este tipo de bomba (**SP**) pode operar em modo de fluxo constante ou de pressão constante. Esta bomba é utilizada para deslocar o fluido pressurizado (ex. CO₂) até o reator **PBR**;

TB1) Banho termostático com recirculação conectado à camisa da bomba de alta pressão (**SP**) que permite que o solvente armazenado no cilindro da bomba seja mantido na temperatura desejada;

TB2) Lavadora ultrassônica de 13.5 litros, com controle de temperatura e pulso (intermitência) ultrassônico, usada para manter a temperatura constante no **PBR**;

MM) Micro-misturador hidrostático, usado para misturar os substratos (solvente + monômero + cossolvente) antes da entrada no reator;

MSC) Coluna com peneiras moleculares, usada para secagem do monômero em fluxo contínuo antes de chegar a **MM**;

HPLP) Bomba de alta pressão de líquidos utilizada para deslocar o monômero (ou mistura de reagentes – MIX) para o reator **PBR** e manter a pressão do sistema constante;

PT) Transmissor de Pressão usado para medir a pressão na saída do reator;

PI) Indicador da Pressão medida pelo transmissor **PT**;

TI) Indicador de Temperatura conectado a um termopar tipo J. O qual foi usado para medir a temperatura do substrato na entrada do (**PBR**);

SB) Reservatório de reagentes (monômero ou monômero + cossolvente) acoplado há um sistema com sílica gel e peneiras moleculares de 4 Å (Figura 3.2.1.2) para evitar a entrada de água no sistema.

PBR) Reator tubular de aço inox 316 L (com 100 cm de comprimento, 3.82 mm de diâmetro interno e diâmetro externo de 1/4 de polegada). O reator (Figura A.2) é empacotado/preenchido em toda sua extensão com enzimas (Novozym 435) previamente secas em estufa a

Apêndice A

vácuo. Este reator é constituído basicamente por 1 metro de tubulação (em aço inox 316 L) de 1/4'' e conexões de entrada (conexão de redução de 1/4'' para 1/16'') e saída (conexão de redução de 1/4'' para 1/8''), bem como por uma conexão para auxiliar na limpeza do reator (união de 1/4'').

Figura A.2 – Reator de leito empacotado (PBR) com suas conexões de entrada de substrato (A) e saída de produtos (B). Onde, (C) é usada para auxiliar na limpeza do reator.

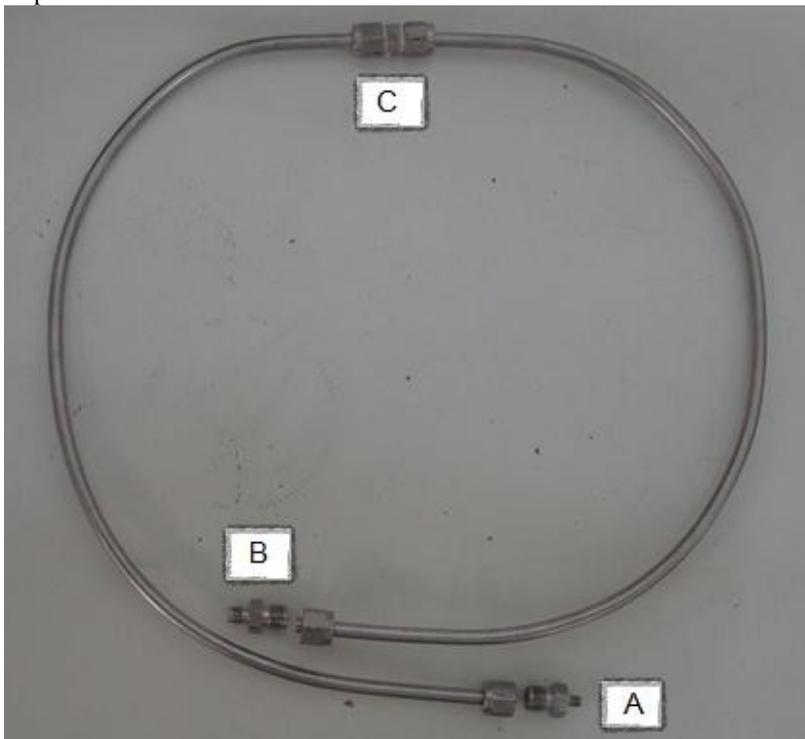


Tabela A.1 – Equipamentos e dispositivos de medição e auxiliares utilizados na montagem da unidade de polimerização a alta pressão em sistema contínuo, juntamente com suas faixas máximas de trabalho/segurança para pressão (bar), temperatura (°C) e potência (Watts RMS), bem como seus respectivos fornecedores e/ou marcas.

Item	* Pressão (bar), Temperatura (°C) e/ou Potência (Watts RMS) máximas de trabalho/segurança	Marca/Fornecedor
Tubulação em aço inox 316L sem costura em polegadas nos diâmetros 1/4", 1/8" e 1/16"	≥ 350 bar a 93 °C	
Porcas e anilhas em polegadas para as tubulações 1/4", 1/8" e 1/16"	≥ 350 bar a 93 °C	Swagelok
Tees e conexões de união e redução entre as tubulações 1/4", 1/8" e 1/16"	≥ 350 bar a 93 °C	
Válvula back pressure regulador série (KPR)	413 bar a 200 °C	
Válvulas de uma via (check valve) série CH4	335 bar a 93 °C	
Válvula agulha de ajuste micrométrico série Milli-Mitre® 1300 Series - 1315GZY	345 bar (-54 a 232 °C)	Hoke
Bomba seringa de alta pressão modelo 500 D	258,5 bar e vazão de 0,001 a 107 ml/min	TELEDYNE ISCO
Conexões de entrada e saída da cabeça da bomba seringa	700 bar a 93 °C	HIP
Transmissor de pressão série 511	0 a 600 bar sob Temp. de -40 a 150 °C	NOVUS
Indicadores de Temperatura e pressão série N-1500	Entrada universal pré ajustada	
Termopares tipo J com bainha flexível protetora para o cabo	-130 a 940 °C	Salvi Casagrande
Banho termostaticado com refrigeração e circulação	0 a 100 °C	Nova Elica
Bomba de alta pressão de líquidos - Digital Serie III	0 a 413 bar e 0,1 a 10 ml/min	LabAlliance
Banho ultrassônico com regulagem de temperatura modelo USC - 4800	270 Watts RMS e Temp. de 0 a 80 °C	Unique
Agitador magnético com aquecimento - modelo ARE	Temp. ambiente a 370 °C	VELP
Cilindro de CO ₂ equipado com tubo pesador	segurança do cilindro (100 bar e 52 °C)	White Martins
Cilindro de n-Butano equipado com tubo pesador	segurança do cilindro (16,5 bar e 52 °C)	

* Os dados referentes às pressões, temperaturas, potências e vazões máximas de trabalho ou segurança foram obtidos através de catálogos disponíveis na internet pelo próprio representante/fornecedor. As fontes para obtenção destes catálogos são apresentadas nas referências deste Apêndice.

A.1.1 - Considerações a respeito da construção/montagem do equipamento

Estrutura: Visando diminuir os custos com a construção/montagem do equipamento para as polimerizações em sistema contínuo a alta pressão. Diversos materiais reciclados a partir do próprio laboratório foram utilizados para a construção da estrutura de abrigo das linhas de alimentação e saída, bem como dos dispositivos de medida de temperatura e pressão do sistema. Para tanto, algumas peças, bem como parafusos de uma antiga prateleira de metal (tipo gôndola) foram utilizadas para a montagem da estrutura desta unidade. Cabe salientar, que tais peças foram utilizadas somente com o intuito de dar suporte e fixação aos equipamentos, linhas e dispositivos de medida e que, não interferem no processo de polimerização propriamente dito.

Tubulações: Todas as linhas de passagem de reagentes/produtos do equipamento foram construídas por tubulações de aço inox 316L sem costura. Sempre que possível, tubulações de 1/16” foram utilizadas com intuito de minimizar o volume das linhas, bem como propiciar uma maior flexibilidade destas para as dobras necessárias no sistema.

Conexões: Uma gama bastante grande de conexões oriundas de diversos fornecedores (Swagelok, Gyrolok, HIP, Hoke e entre outros) pode ser obtida comercialmente para aplicações em sistemas de alta pressão. Neste contexto, cada fornecedor detém peculiaridades de fabricação de seus produtos de forma que, o uso destes em conjunto com produtos de outro fabricante podem levar a sérios problemas estruturais. Logo, deve-se salientar que, apesar de a unidade montada no presente trabalho conter conexões de diversos fornecedores, todas as conexões foram montadas de acordo com especificações do fabricante. Para tanto, ⁴catálogos, manuais e sempre que possível, informações diretamente com o fornecedor dos produtos, foram utilizados para uma maior confiabilidade na construção do equipamento. Neste sentido, manuais digitais, em CDs e até mesmo cursos práticos de montagem de conexões são oferecidos pelos fornecedores deste tipo de material. Neste quesito, (propagandas a parte) os fornecedores da Swagelok têm demonstrado bastante interesse na satisfação de seus clientes oferecendo inclusive cursos práticos de montagem de curta duração no próprio laboratório LATESC.

⁴ As fontes para a obtenção dos principais catálogos e manuais utilizados na montagem da unidade de polimerização desta Tese são apresentadas nas referências.

A.2 – REFERÊNCIAS

WHITE MARTINS. **Gases especiais e equipamentos**. Disponível em: http://www.praxair.com.br/~media/South%20America/Brazil/Documents/Specialty%20gases/vImpressa%20%20Catlogo%20GE%20%20Miolo%20%20AGO_2013%20%20LAYOUT%2002%20%20Pgs%20Independentes.ashx. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

HIP. **High pressure equipment company**. Disponível em: <http://www.conexoesevalvulas.com.br/HIP.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

NOVUS. **Indicador N1500. Indicador universal - Manual de instruções – V2.3x D**. Disponível em: <http://www.novus.com.br/downloads/Arquivos/v23x%20d%20-%20manual%20n1500%20-%20portuguese%20a4.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

SWAGELOK. **Check Valves (MS-01-176)**. Disponível em: <http://www.atlantichose.com/pdf/Valves/Check%20Valves.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

SWAGELOK. **Dados Técnicos Sobre Tubos (MS-01 -107)**. <http://www.swagelok.com/downloads/WebCatalogs/PT/MS-01-107.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

SWAGELOK. **Pressure Regulators (MS-02-230)**. <http://www.swagelok.com/downloads/webcatalogs/EN/MS-02-230.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

SWAGELOK. **Conexões e Adaptadores para tubos. Aperto verificável através de calibre (MS-01-140)**. <http://www.swagelok.com/downloads/WebCatalogs/PT/MS-01-140.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

SWAGELOK. **An Installer's Pocket Guide for Swagelok® Tube Fittings (MS-13-151)**. <http://www.swagelok.com/downloads/webcatalogs/EN/MS-13-151.pdf>. Acesso em: 12 de setembro de 2013.

APÊNDICE B – VALORES TABELADOS DE Y E M_n OBTIDOS DURANTE A PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA SEM O USO DE COSSOLVENTE.

As Tabelas (B.1e B.2) apresentam os valores de rendimento das reações (Y) de e-ROP de ε-CL realizadas a 120 bar e razões S/M de 2:1 e 1:2 respectivamente, enquanto as Tabelas (B.3 e B.4) apresentam os valores de Y obtidos para as reações realizadas a 200 bar e razões S/M de 2:1 e 1:2 respectivamente.

Os valores de M_n das reações de e-ROP de ε-CL realizadas a 120 bar e razões S/M de 2:1 e 1:2 são apresentados respectivamente pelas Tabelas (B.5 e B.6), já as Tabelas (B.7 e B.8) apresentam os resultados de M_n para as reações de e-ROP de ε-CL realizadas a 200 bar e razões S/M de 2:1 e 1:2 respectivamente.

Tabela B.1 – Rendimento das reações de e-ROP de ε-CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)						
	10,7	8,6	4,3	2,9	2,1	1,7	1,4
	Rendimento da reação (%)						
2 τ ^a	60,1	55,2	45,3	35,7	24,8	17,6	12,2
4 τ	32,5	31,6	31,6	27,4	20,1	12,5	7,0
6 τ	24,3	21,1	21,2	16,9	18,9	9,3	3,8
8 τ	20,4	18,2	20,5	15,7	18,4	6,9	3,7
10 τ	19,9	14,9	15,5	14,6	16,9	6,6	2,9
12 τ	19,9	15,5	12,8	11,8	15,7	6,0	2,8

^a Onde, para τ = 10,7 min., 2 τ = 21.4 min.

Tabela B.2 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	17,8	8,9	5,9	4,4	3,6	3,0
	Rendimento da reação (%)					
2 τ ^a	50,9	34,0	23,9	20,1	17,6	12,8
4 τ	48,5	8,6	6,8	8,3	5,4	11,2
6 τ	36,3	4,4	5,5	7,7	3,8	6,5
8 τ	34,0	4,3	3,6	6,3	2,8	4,9
10 τ	33,6	3,6	3,2	5,0	2,6	4,5
12 τ	31,4	2,9	3,8	6,2	2,5	4,0

^a Onde, para $\tau = 17,8$ min., $2 \tau = 35,6$ min.

Tabela B.3 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)						
	17,9	8,9	4,5	3,0	2,2	1,8	1,5
	Rendimento da reação (%)						
2 τ ^a	53,5	48,7	37,5	25,7	16,2	15,6	13,7
4 τ	37,9	33,9	31,1	18,4	13,7	11,8	11,0
6 τ	34,6	28,1	23,4	14,6	10,1	9,7	8,5
8 τ	29,5	24,2	20,9	12,4	9,6	8,2	7,6
10 τ	29,2	23,1	19,5	9,3	6,9	6,2	5,4
12 τ	25,6	23,4	17,5	8,0	7,0	6,9	6,3

^a Onde, para $\tau = 17,9$ min., $2 \tau = 35,8$ min.

Apêndice B

Tabela B.4 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar e 65 °C para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	31,25	25,0	12,5	6,3	4,2	3,1
	Rendimento da reação (%)					
2 τ ^a	48,46	42,07	27,36	15,52	14,20	13,10
4 τ	36,00	32,53	20,48	14,38	11,50	10,20
6 τ	36,19	31,08	21,97	9,81	8,80	8,30
8 τ	34,35	32,17	19,19	6,80	7,50	7,20
10 τ	34,51	29,46	21,82	5,85	5,80	5,40
12 τ	34,14	27,13	15,77	6,74	5,90	5,10

^a Onde, para $\tau = 31,25$ min., $2 \tau = 62,5$ min.

Tabela B.5 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)						
	10,7	8,6	4,3	2,9	2,1	1,7	1,4
	M_n (Da)						
2 τ ^a	21700	20630	14500	10070	9910	9830	9430
4 τ	25012	24453	17980	14900	9650	9580	9450
6 τ	20453	19000	17310	12610	9200	9120	8800
8 τ	18467	18230	15560	11810	8720	8540	8500
10 τ	17000	16903	14320	10143	8456	8250	8090
12 τ	16420	16920	12854	9780	7980	7930	7800

^a Onde, para $\tau = 10,7$ min., $2 \tau = 21,4$ min.

Tabela B.6 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	17,8	8,9	5,9	4,4	3,6	3,0
	M_n (Da)					
$2 \tau^a$	29500	26700	15200	10830	8760	8320
4τ	33000	26900	13500	12670	9800	9630
6τ	32300	26100	10800	9780	8900	8800
8τ	29800	25400	9600	9360	8580	8700
10τ	29100	24500	8720	8470	8250	8120
12τ	28500	24200	8100	8010	8050	8000

^a Onde, para $\tau = 17,8$ min., $2 \tau = 35,6$ min.

Tabela B.7 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar, para razões S/M de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)						
	17,9	8,9	4,5	3,0	2,2	1,8	1,5
	M_n (Da)						
$2 \tau^a$	35800	24100	20300	16700	13500	12800	10200
4τ	40300	24430	21450	18270	15200	14940	14360
6τ	41550	25500	21600	17900	16500	14860	14550
8τ	40200	27750	20800	17150	15800	14620	14710
10τ	37600	27600	20500	16800	15500	14600	14530
12τ	36120	27500	20200	16220	15300	14380	14400

^a Onde, para $\tau = 17,9$ min., $2 \tau = 35,8$ min.

Apêndice B

Tabela B.8 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL a 200 bar, para razões S/M de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	31,25	25,0	12,5	6,3	4,2	3,1
	M_n (Da)					
2 τ ^a	25100	22500	13700	9700	9600	9500
4 τ	20800	16300	11500	11100	9100	9600
6 τ	17000	15200	10600	11400	9000	9200
8 τ	13600	13500	10200	10100	8600	8100
10 τ	11900	12900	10100	10200	8300	8000
12 τ	10300	10500	9500	9500	7900	7900

^a Onde, para $\tau = 31,25$ min., 2 $\tau = 62,5$ min.

APÊNDICE C – VALORES TABELADOS DE Y, M_n E IP OBTIDOS DURANTE A PRODUÇÃO DE PCL REALIZADA COM O USO DE COSSOLVENTE.

A produção de policaprolactona com uso de cossolvente foi realizada de forma a testar diversas variáveis de processo na busca por uma melhor eficiência no processo de polimerização enzimática de ϵ -CL. Desta forma, visando uma melhor organização/apresentação dos dados experimentais, as tabelas foram apresentadas neste apêndice na forma de grupos de dados para cada variável de processo testada no capítulo 4.

C.1 – EFEITO DO USO DE COSSOLVENTE NAS REAÇÕES DE e-ROP

As reações preliminares de e-ROP de ϵ -CL realizadas com cossolvente (no presente trabalho) foram todas realizadas com diclorometano (DCM) como cossolvente. Logo, os dados experimentais apresentados nas seções (C.1 e C.2) são todos obtidos com DCM como cossolvente.

Desta forma, as Tabelas (C.1e C.2) apresentam os valores de rendimento das reações (Y) de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e razões S/MIX de 2:1 e 1:2 respectivamente, enquanto que, as Tabelas (C.3 e C.4) apresentam os valores de M_n obtidos para as mesmas reações realizadas a 120 bar e razões S/MIX de 2:1 e 1:2 respectivamente.

Apêndice G

Tabela C.1 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	30,0	15,0	10,0	5,0	3,0	1,5
	Rendimento da reação (%)					
1 τ ^a	94,1	93,3	84,5	55,0	35,3	30,8
2 τ	92,5	92,2	86,0	53,2	34,6	31,4
3 τ	94,3	90,5	85,5	55,8	34,5	29,7
4 τ	91,3	90,6	84,9	54,3	35,1	26,1
5 τ	92,4	91,6	86,2	54,6	37,7	25,0
6 τ	91,2	90,8	85,3	53,1	35,6	25,4

^a Onde, para $\tau = 30$ min., $2 \tau = 60$ min.

Tabela C.2 – Rendimento das reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar e 65 °C para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	30,0	15,0	10,0	5,0	3,0	1,5
	Rendimento da reação (%)					
1 τ ^a	94,6	70,1	55,0	42,4	34,5	30,3
2 τ	90,3	70,1	57,0	41,1	34,0	31,5
3 τ	89,4	68,2	55,7	43,9	33,0	32,3
4 τ	90,7	67,1	55,7	42,6	33,7	31,3
5 τ	93,2	68,4	55,0	41,0	33,6	30,2
6 τ	91,4	68,5	54,2	41,5	33,5	30,8

^a Onde, para $\tau = 30$ min., $2 \tau = 60$ min.

Tabela C.3 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar, para razões S/MIX de 2:1 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	30,0	15,0	10,0	5,0	3,0	1,5
	M_n (Da)					
1 τ^a	23000	22500	21900	13800	11200	8800
2 τ	22600	23400	22100	13600	11000	9500
3 τ	21400	20700	20300	12200	10100	9300
4 τ	18200	17500	18800	11500	9400	10100
5 τ	17400	17100	17000	11600	9700	9200
6 τ	17200	16600	16300	10300	9200	8500

^a Onde, para $\tau = 30$ min., $2 \tau = 60$ min.

Tabela C.4 – M_n dos polímeros obtidos nas reações de e-ROP de ϵ -CL com o uso de cossolvente a 120 bar, para razões S/MIX de 1:2 para prolongados tempos de uso da enzima.

tempo de processamento de reagentes (min.)	tempo espacial τ (min.)					
	30,0	15,0	10,0	5,0	3,0	1,5
	M_n (Da)					
1 τ^a	14200	14500	12100	10100	8500	4300
2 τ	14100	13800	10100	8600	10400	4500
3 τ	13600	12300	10600	9900	9500	4200
4 τ	12700	11500	9300	10600	8900	4300
5 τ	12700	11100	9600	7900	8300	4900
6 τ	12000	11000	9500	8600	7700	5000

^a Onde, para $\tau = 30$ min., $2 \tau = 60$ min.

C.2 – EFEITO DA QUANTIDADE DE ÁGUA NA ENZIMA E NOS REAGENTES PARA AS REAÇÕES DE e-ROP COM COSSOLVENTE

A partir dos dados experimentais preliminares com o uso de cossolvente observou-se que a condição de razão mássica de S/MIX mais adequada para a produção de PCL foi a condição de 2:1 [scCO₂/(ε-CL+cossolvente)]. Portanto, deste ponto em diante todos os ensaios experimentais apresentados foram realizados sob condição de razão mássica de S/MIX de 2:1. Neste contexto, a Tabela (C.5) apresenta os efeitos causados por diferentes quantidades de água inicial na enzima (%) sob os valores de rendimento das reações (Y), enquanto a Tabela (C.6) apresenta este efeito sob os valores de M_n, ambas as tabelas se referem às reações de e-ROP de ε-CL realizadas a 120 bar e razão S/MIX de 2:1 usando DCM como cossolvente.

Tabela C.5 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) sob o rendimento das reações de e-ROP de ε-CL a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	teor de água nas enzimas %			
	1,15	0,69	0,28	0,10
	Rendimento da reação (%)			
15	94,1	92,8	90,3	86,5
30	92,5	92,6	91,2	87,4
45	94,3	91,7	90,7	86,5
60	91,3	92,4	90,5	86,7
75	92,4	90,6	89,7	86,4
90	91,2	91,9	89,5	86,2

Tabela C.6 – Efeito da quantidade de água inicial na enzima (%) sob os valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	teor de água nas enzimas %			
	1,15	0,69	0,28	0,10
	M_n (Da)			
15	22500	20800	19400	21700
30	23400	23100	22400	23200
45	20700	25900	24700	23800
60	17500	28500	23500	23800
75	17100	30800	23300	23300
90	16600	31200	23100	22800

Já a Tabela (C.7) apresenta os efeitos causados por diferentes quantidades de água na mistura de reagentes MIX (%) sob os valores de rendimento das reações (Y), enquanto a Tabela (C.8) apresenta este efeito sob os valores de M_n , ambas estas tabelas se referem às reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e razão S/MIX de 2:1 usando DCM como cossolvente.

Tabela C.7 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) no rendimento das reações (Y) de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	teor de água em ^a MIX (%)				
	0,04	0,09	0,14	0,54	1,04
	Rendimento da reação (%)				
15	94,1	93,5	94,5	90,1	85,2
30	92,5	94,7	92,9	89,7	86,7
45	94,3	91,8	94,4	89,3	85,3
60	91,3	92,8	94,7	88,4	86,6
75	92,4	93,6	95,1	87,6	84,3
90	91,2	93,9	95,3	86,5	83,4

^a Onde, MIX = mistura de reagentes (50 % ϵ -CL + 50 % DCM).

Apêndice G

Tabela C.8 - Efeito da quantidade de água inicial em MIX (%) nos valores de M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	teor de água em ^a MIX (%)				
	0,04	0,09	0,14	0,54	1,04
	M_n (Da)				
15	20800	19700	18500	13900	10700
30	23100	19000	18500	13700	10600
45	25900	22500	19100	12500	10500
60	28500	21600	19900	12600	10100
75	30800	22200	19600	12200	9400
90	31200	21900	19300	12000	8800

^a Onde, MIX = mistura de reagentes (50 % ϵ -CL + 50 % DCM).

C.3 – EFEITO DO TIPO DE COSSOLVENTE NAS REAÇÕES DE e-ROP

A fim de determinar qual o melhor cossolvente para as reações de polimerização em modo contínuo, diferentes cossolventes (DCM, THF, Tolueno) foram testados quanto ao seu efeito sob os valores de Y e M_n das reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos. Estes efeitos são apresentados pela Tabela (C.9), para os valores de Y e Tabela (C.10) para os valores de M_n das reações de polimerização.

Tabela C.9 - Efeito do tipo de cossolvente nos rendimentos de reação (%) para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	Cossolvente		
	DCM	THF	TOL
	Rendimento da reação (%)		
15	94,1	84,4	94,2
30	92,5	85,6	92,5
45	94,3	89,1	96,7
60	91,3	89,3	94,7
75	92,4	88,6	93,3
90	91,2	87,8	92,5

Tabela C.10 - Efeito do tipo de cossolvente nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	Cossolvente		
	DCM	THF	TOL
	M_n (Da)		
15	20800	16800	17500
30	23100	18100	20300
45	25900	21300	24200
60	28500	24600	24500
75	30800	23400	24900
90	31200	24700	25800

C.4 – EFEITO DE ONDAS ULTRASSÔNICAS NAS REAÇÕES DE e-ROP REALIZADAS COM COSSOLVENTE

O uso de ondas ultrassônicas nas reações de e-ROP têm se mostrado promissor. Devido a isso testes com ondas ultrassônicas foram realizadas em reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas em sistema contínuo sob pressão de 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos, usando DCM como cossolvente. Neste sentido, a Tabela (C.11) apresenta os valores de Y enquanto a Tabela (C.12) apresenta os valores de M_n e IP para as reações de polimerização realizadas com e sem o uso de ultrassom.

Tabela C.11 - Efeito de ondas ultrassônicas nos valores de rendimentos de reação para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	Rendimento da reação (%)	
	Sonicado	Não Sonicado
15	91,3	94,1
30	93,3	92,5
45	93,0	94,3
60	93,1	91,3
75	91,8	92,4
90	92,3	91,2

Tabela C.12 - Efeito de ondas ultrassônicas nos valores de M_n e de IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	Sonicado		Não Sonicado	
	M_n (Da)	IP	M_n (Da)	IP
15	25800	1,4	20800	1,6
30	26100	1,4	23100	1,5
45	27800	1,4	25900	1,5
60	28400	1,3	28500	1,5
75	29700	1,3	30800	1,5
90	31600	1,3	31200	1,4

C.4 – EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE MONÔMERO NAS REAÇÕES DE e-ROP REALIZADAS COM COSSOLVENTE

A concentração de monômero no meio reacional é um dos parâmetros mais importantes dentro da área de polimerização enzimática de ϵ -CL, podendo exercer forte influência nos resultados finais do polímero obtido. Por isso, diferentes concentrações de monômero na mistura de reagentes (MIX) foram testadas para reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas sob pressão de 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos, usando DCM como cossolvente. Os resultados obtidos para os rendimentos de reação (Y) são apresentados pela Tabela (C.13) enquanto que os resultados obtidos para M_n são apresentados pela Tabela (C.14).

Apêndice G

Tabela C.13 - Efeito da concentração de ϵ -CL nos valores de Y para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	razão mássica de MIX (ϵ -CL/DCM)		
	2:1	1:1	1:2
	Rendimento da reação (%)		
15	94,3	94,1	96,9
30	92,7	92,5	97,6
45	94,5	94,3	97,8
60	94,7	91,3	98,5
75	93,3	92,4	99,2
90	94,2	91,2	98,9

Tabela C.14 - Efeito da concentração de ϵ -CL nos valores de M_n para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos.

tempo de processamento de reagentes (min.)	razão mássica de MIX (ϵ -CL/DCM)		
	1:2	1:1	2:1
	M_n (Da)		
15	13600	20800	27100
30	15200	23100	31300
45	14300	25900	33000
60	13800	28500	34400
75	13600	30800	34800
90	13500	31200	35300

C.4 – REAÇÕES DE e-ROP REALIZADAS COM N-BUTANO NA PRESENÇA DE COSSOLVENTE

A possibilidade de obtenção de maiores atividades enzimáticas no meio reacional devido ao uso de diferentes fluidos pressurizados justifica o esforço experimental realizado neste sentido por diferentes pesquisadores nos últimos anos. Neste contexto, a Tabela (C.15) apresenta os resultados de Y, M_n e IP para reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas sob pressão de 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos, usando DCM como cossolvente.

Tabela C.15 - Valores de Y, M_n e IP para as reações de e-ROP de ϵ -CL realizadas a 120 bar e 65 °C para razão S/MIX de 2:1 em tempos espaciais (τ) fixos de 15 minutos usando n-butano como solvente.

tempo de processamento de reagentes (min.)	n-butano/MIX = 2:1		
	Y (%)	M_n (Da)	IP
15	76,1	13900	1,5
30	81,3	16800	1,5
45	77,6	18100	1,4
60	82,4	23300	1,5
75	83,7	24600	1,4
90	83,5	25400	1,4