



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE  
ALIMENTOS**

**ROSENY DINAH SANTOS**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)  
EM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

**Florianópolis/SC  
2011**



**ROSENY DINAH SANTOS**

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)  
EM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos na Indústria de Alimentos.

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra R. S. Ferreira

**Co-Orientador:** Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

**Florianópolis/SC  
2011**

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária  
da  
Universidade Federal de Santa Catarina

S237p Santos, Roseny Dinah  
Produção enzimática de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico [dissertação] / Roseny Dinah Santos ; orientadora, Sandra Regina Salvador Ferreira. - Florianópolis, SC, 2011.

79 v.: il., grafs., tabs.

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

Inclui referências

1. Engenharia de alimentos. 2. Polímeros. 3. Lipase. 4. Dióxido de carbono. 5. Biopolímeros. I. Ferreira, Sandra Regina Salvador. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Título.

CDU 663





*Dedico este trabalho aos meus pais,  
Raimundo e Hortencia, pela educação,  
amor e apoio, e ao meu namorado,  
Harri, por ter estado sempre ao meu lado  
e me encorajado nos momentos mais  
difíceis, aqui e a quilômetros de  
distância.*





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por abençoar sempre a minha vida pessoal e profissional, concedendo mais uma vitória na minha vida.

Aos meus pais e irmãos, Helcio e Rossane, pelo carinho, incentivo e ajuda.

À Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra R. S. Ferreira e ao Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira, pela orientação, confiança e ensinamentos transmitidos.

À Sibeles Rosso, por ter sido como minha terceira orientadora, pela dedicação, paciência e grande ajuda no desenvolvimento deste trabalho, que com certeza fez todo o diferencial.

Aos professores da URI – Erechim, Débora de Oliveira, Helen Treichel, Marco Di Luccio e professor Tuca, pela colaboração neste trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI pela assistência e disponibilização do laboratório para a realização dos experimentos. Em especial, agradeço às meninas da Iniciação Científica, Aline, Eline e Mel pela ajuda com os experimentos e momentos de alegria nas horas mais críticas. Agradeço à Bebel pela colaboração já na reta final, mas que fez toda a diferença. Ao Anderson pela paciência e por colaborar com as análises de cromatografia.

Agradeço ao pessoal do LATESC em Florianópolis, por ter feito parte do grupo de pesquisa do laboratório e pela disposição. Especialmente à Kátia pela amizade conquistada.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da UFSC pela oportunidade do mestrado.

Agradeço aos meus amigos, Lívia, Daiane, Diana, Anderson e Tiago pelo incentivo e momentos de distração em Florianópolis. E às amigas de Aracaju, Érica, Silviane e Catarina por torcerem pelo meu sucesso.

Agradeço ao Harri, meu amor, pela paciência, compreensão e por acreditar que tudo daria certo.

A CAPES e ao CNPq pelo apoio financeiro.

E por fim, quero agradecer a todos que não citei, mas que de alguma forma colaboraram para o desenvolvimento deste trabalho.



## RESUMO

Policaprolactona (PCL) é um dos mais atrativos poliésteres alifáticos para aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e compatibilidade com uma ampla faixa de polímeros. Diversas aplicações biomédicas podem ser encontradas na literatura sobre policaprolactona e seus copolímeros. Tradicionalmente, a PCL tem sido sintetizada por polimerização em massa, em solução ou em suspensão. Para qualquer destas técnicas é utilizado um iniciador organometálico na presença ou ausência de um co-iniciador contendo hidrogênio ativo. A poli( $\epsilon$ -caprolactona) e seus copolímeros podem ser sintetizados quimicamente através do método da policondensação e do método da polimerização pela abertura do anel de ésteres cíclicos (lactonas, lactídeos e glicolídeos), o qual permite preparar poliésteres de alta massa molar. A utilização de enzimas como catalisadores na polimerização por abertura de anel vem se tornando uma alternativa bastante atrativa devido à polimerização ocorrer em condições mais amenas, principalmente no que concerne à temperatura. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi investigar a produção de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico catalisada por enzima, especificamente a lipase comercial Novozym 435<sup>®</sup>. Os parâmetros empregados para avaliação da produção foram a massa molar e o índice de polidispersão obtidos na reação. Além disto, foi determinada a atividade da enzima após a reação com o intuito de verificar a possibilidade de seu reuso. Foram realizados dois planejamentos experimentais. No primeiro, as variáveis estudadas foram o binômio temperatura/pressão (35 a 65 °C/ 83 a 145 bar), a quantidade de enzima (1 a 10 %), a quantidade de água (0 a 2,5 %) e a agitação do meio (200 a 400 rpm). O diagrama de Pareto mostrou que apenas a variável quantidade de enzima foi significativa, no nível de 90 % de significância, para as faixas de condições estudadas. As massas molares médias numéricas variaram de 1050,4 a 7419,6 g/gmol. Não houve perda significativa de atividade enzimática após a reação com aumento de atividade em alguns casos, considerando-se o nível de significância de 90 % no diagrama de Pareto. O segundo planejamento avaliou os efeitos do deslocamento da faixa de estudo para níveis mais altos: pressão (150 a 200 bar), quantidade de enzima (5 a 15 %) e quantidade

de água (0 a 4 %). Os resultados mostraram que o aumento dos níveis das variáveis operacionais não causou alteração estatisticamente significativa das reações para o nível de significância de 90 % no gráfico de Pareto. Nesse planejamento, as massas molares variaram de 1099,5 a 1463 g/gmol. Como a quantidade de água estava maior no sistema do segundo planejamento experimental (monômero, dióxido de carbono, enzima e, em alguns casos, água), uma das razões para a diminuição das massas molares em geral, poderia ser o efeito deletério da água no mecanismo da reação. A atividade enzimática para o segundo planejamento apresentou tendência a ser significativa no diagrama de Pareto para o nível de 90 % de confiança. Esse resultado também é considerável na diminuição das massas molares dos polímeros obtidos visto a importância da atividade da enzima no desencadeamento das reações. Os resultados obtidos nesse trabalho demonstram que o uso de catalisador enzimático e fluido supercrítico pode ser tão efetivo quanto às técnicas que empregam catalisadores metálicos e meios orgânicos, com a vantagem de não apresentarem toxicidade e não necessitar de tratamento para o descarte no ambiente.

*Palavras-chave:* policaprolactona, lipase, dióxido de carbono, biopolímero.

## ABSTRACT

Polycaprolactone (PCL) is one of the most attractive aliphatic polyesters for biomedical applications due to its biocompatibility, biodegradability and compatibility with a wide range of the polymers. Several biomedical applications can be found in the literature using poly( $\epsilon$ -caprolactone) and their copolymers. Traditionally, the PCL has been synthesized by bulk polymerization, solution or suspension. In any of these techniques it is used organometallic initiators in the presence or absence of a co-initiator containing active hydrogen. The poly( $\epsilon$ -caprolactone) and its copolymers can be chemically synthesized by the method of polycondensation and the method of polymerization by ring-opening of cyclic esters (lactones, lactide and glicolides), which allows to prepare high molecular weight polyesters. The use of enzymes as catalysts in the polymerization by ring-opening has become a very attractive alternative because the polymerization occurs in milder conditions, especially in relation to the temperature. The aim of this work was to synthesize poly( $\epsilon$ -caprolactone) in supercritical carbon dioxide catalyzed by lipase, namely Novozym 435®. Enzymatic reactions were evaluated taking into account the molar mass and polydispersity index obtained. Besides, the enzyme activity was evaluated after polymerization reactions. Two experimental designs were carried out: in the first, the variables were binomial temperature/pressure (35 to 65 °C/ 83 to 145 bar), enzyme concentration (1 to 10 wt %), water content (0 to 2.5 wt %) and agitation (200 to 400 rpm). The Pareto diagram showed the enzyme concentration was significant (90 % confidence interval) in the experimental ranges investigated. The average molecular weight for the polymers ranged from 1050.4 to 7419.6 g/gmol. Enzymatic activity did not suffer significant changes for 90 % confidence interval. The second planning evaluated the effects of those variables at higher levels: pressure (150 to 200 bar), enzyme concentration (5 to 15 wt %), water content (0 to 4 wt %). Results showed that increasing levels of process variables did not cause a change for the statistical results of the reactions (90 % confidence interval). In these planning, the molecular weight ranged from 1099.5 to 1463 g/gmol. As the water concentration was higher in the second planning system, one of the reasons for the decrease of the masses in general, could be the deleterious effect of water on the

reaction mechanism. The enzyme activity for the second design tended to be significant in the Pareto's chart for the 90 % confidence interval. This result is also considerable for the decrease in the molecular weight of polymers whereas the importance of enzyme activity for the reactions. Results obtained in this study may be considered relevant as it is shown that the use of enzyme catalysts and supercritical fluids may be as effective compared to the traditional metal catalysts and organic medium, due to the advantages as no toxicity and does not require any treatment for disposal in the environment.

*Keywords:* polycaprolactone, lipase, carbon dioxide, biopolymer.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 3.1. Representação esquemática de estruturas moleculares das cadeias poliméricas. (a) Lineares, (b) Ramificadas, (c) Com ligações cruzadas e (d) Em rede. ....28
- Figura 3.2. Representação esquemática de um homopolímero e de copolímeros. ....28
- Figura 3.3. Representação das reações de polimerização: (a) Formação de poliéster por meio da policondensação entre um diol e um diácido, com eliminação de água. (b) Polimerização do estireno exemplificando a formação de um polímero de adição, em que  $n$  é o grau de polimerização do polímero resultante.....29
- Figura 3.4. Tipos de polimerização. (a) Polimerização em cadeia para a formação de polietileno. (b) Reação em etapas representada pela formação de um polioli poliéster.. ....30
- Figura 3.5. Fotografia em tamanho natural de flocos de poli( $\epsilon$ -caprolactona) de aproximadamente 3 mm de diâmetro e massa molar entre 70000 e 90000 g/gmol determinado por GPC.....36
- Figura 3.6. Estrutura química da  $\epsilon$ -caprolactona e poli( $\epsilon$ -caprolactona). (a) Estrutura química da  $\epsilon$ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular  $C_6H_{10}O_2$ . (b) Estrutura da poli( $\epsilon$ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a  $\epsilon$ -caprolactona, com o anel aberto .....36
- Figura 3.7. Estrutura tridimensional da CAL-B.....39
- Figura 3.8. Mecanismo de polimerização de lactonas por abertura do anel. ....40
- Figura 3.9. Esboço do mecanismo da polimerização enzimática da  $\epsilon$ -caprolactona e quatro rotas indicadas por I (formação do complexo ativo), II (formação do polímero), III

(propagação do polímero) e IV (formação de oligômeros cíclicos) .....	41
Figura 3.10. Diagrama P-T para um fluido puro.....	42
Figura 4.1. Amostra da enzima utilizada nas reações, lipase comercial imobilizada <i>Candida antarctica</i> , a Novozym 435 <sup>®</sup> .....	46
Figura 4.2. Diagrama esquemático do aparato experimental.....	47
Figura 4.3. Vista geral da unidade de reação.....	48
Figura 4.4. Sistema composto de um banho termostático e reatores de vidro utilizados para a determinação da atividade enzimática. ....	50
Figura 4.5. Cromatógrafo HPLC AGILENT 1100 Series utilizado nas análises por GPC.....	52
Figura 5.1. Poli( $\epsilon$ -caprolactona) produzida no primeiro planejamento experimental a 65 °C, 145 bar, 10 % de enzima, 200 rpm de agitação e sem adição de água.....	57
Figura 5.2. Diagrama de Pareto para a massa molar média numérica do primeiro planejamento experimental com nível de significância de 90 %. ....	58
Figura 5.3. Diagrama P-x-y para o sistema binário CO <sub>2</sub> (1) + $\epsilon$ -caprolactona (2).....	59
Figura 5.4. Diagrama de Pareto para a massa molar média numérica do segundo planejamento (nível de 90 % de significância). ....	63
Figura 5.5. Poli( $\epsilon$ -caprolactona) produzida no segundo planejamento experimental a 65 °C, 200 bar, 15 % de enzima, 200 rpm de agitação e sem adição de água.....	64
Figura 5.6. Diagrama de Pareto para a atividade enzimática do primeiro planejamento no nível de 90 % de significância. 67	
Figura 5.7. Diagrama de Pareto para a atividade enzimática do segundo planejamento no nível de 90 % de significância. . 69	





## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Características da lactona estudada.....	45
Tabela 4.2. Níveis das variáveis investigadas nos planejamentos experimentais.....	53
Tabela 5.1. Resultados do primeiro planejamento para a produção de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em CO <sub>2</sub> à alta pressão catalisada por lipase.....	56
Tabela 5.2. Resultados do segundo planejamento experimental da produção de policaprolactona em CO <sub>2</sub> à alta pressão catalisada por lipase.....	62
Tabela 5.3. Atividade enzimática após as reações realizadas no primeiro planejamento experimental.....	66
Tabela 5.4. Atividade enzimática após as reações do segundo planejamento experimental.....	68



## LISTA DE ABREVIATURAS

CAL-B	Lipase da <i>Candida antarctica</i> – fração B
DP	<i>Degree of Polymerization</i> (Grau de Polimerização)
EAM	<i>Enzyme-activated monomer complex</i> (Complexo monômero ativado pela enzima)
$\epsilon$ -CL	$\epsilon$ -caprolactona
GPC	<i>Gel Permeation Chromatography</i> (Cromatografia de Permeação em Gel)
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IP	Índice de Polidispersão
M	Molaridade da solução de hidróxido de sódio (mol/L)
$M_E$	Massa de enzima utilizada na reação (g)
$M_i$	Massa molar média da faixa de tamanhos $i$
$\overline{M}_n$	Massa molar média numérica (g/gmol)
$m_u$	Massa molar da unidade repetitiva
$\overline{M}_w$	Massa molar média ponderada (g/gmol)
PCL	Poli( $\epsilon$ -caprolactona)
PE	Poli(etileno)
PET	Poli(tereftalato de etileno)
PP	Poli(propileno)
PVC	Poli(cloreto de vinila)
RID	<i>Refractive Index Detector</i> (Detector de Índice de Refração)
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i> (Cromatografia por Exclusão de Tamanho)
$t$	Tempo de reação (min)
$V_a$	Volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero (mL)
$V_b$	Volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra após 40 minutos de reação (mL)
$V_e$	Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL)
$V_f$	Volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação (mL)
$w_i$	Fração em peso das moléculas na faixa de tamanhos $i$
$x_i$	Fração em número das moléculas na faixa de tamanhos $i$



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	25
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>27</b>
3.1 POLÍMEROS.....	27
3.1.1 Classificação, estrutura e tipos de polímeros.....	27
3.1.2 Massa molar e distribuição de massa.....	30
3.1.3 Mercado de polímeros.....	32
3.2 A IMPORTÂNCIA DOS BIOPOLÍMEROS COMO BIOMATERIAIS.....	33
3.2.1 Biodegradabilidade e biocompatibilidade.....	34
3.3 POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA).....	35
3.4 MERCADO DE BIOPOLÍMEROS.....	37
3.5 LIPASES COMO CATALISADORES.....	38
3.6 POLIMERIZAÇÃO POR ABERTURA DO ANEL “RING-OPENING POLYMERIZATION” (ROP).....	39
3.7 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS.....	41
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>45</b>
4.1 MATERIAIS.....	45
4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	46
4.2.1 Aparato experimental das reações de polimerização.....	46
4.2.2 Determinação da atividade enzimática.....	49
4.2.3 Análises por GPC (Gel Permeation Chromatography).....	51
4.2.4 Planejamento experimental.....	52
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>55</b>
5.1 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO.....	55
5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	64
<b>6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....</b>	<b>71</b>
6.1 CONCLUSÕES.....	71
6.2 SUGESTÕES.....	71
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Materiais poliméricos, naturais e sintéticos, são indispensáveis para a sociedade moderna (KOBAYASHI; MAKINO, 2009). Eles têm um papel importantíssimo por estarem presentes em praticamente todos os setores da economia como medicina, agricultura, construção civil, embalagens e eletroeletrônicos. A produção destes produtos é estimada na ordem de 180 milhões ton/ano, sendo que a quantidade de resíduos de materiais poliméricos descartados no ambiente chega a 20 % do total produzido (BORSCHIVER; ALMEIDA; ROITMAN, 2008; FRANCHETTI; MARCONATO, 2006). A grande maioria desses polímeros é obtida a partir de monômeros derivados do petróleo, fonte não-renovável e geradora de poluentes de degradação lenta tanto na produção quanto no descarte.

A partir da década de 80 e, mais efetivamente, na década de 90, houve uma maior preocupação com o desenvolvimento de uma sociedade sustentável. A utilização de recursos naturais renováveis como alternativa para produtos derivados de combustíveis fósseis vem ganhando preferência, principalmente devido à sua disponibilidade inesgotável e às condições ambientais (van DAM; KLERK-ENGELS; RABBINGE, 2005; JUAIS, 2009).

A produção de polímeros biodegradáveis de alta pureza é uma questão importante, considerando seu potencial de aplicação na medicina e na indústria de alimentos (GREGOROWICZ, 2008). Borschiver, Almeida e Roitman (2008) realizaram um monitoramento tecnológico e mercadológico de biopolímeros entre 2002 e 2007, onde encontraram que o PHA (polihidroxialcanoato) apresentou o maior número de artigos publicados e a área medicinal a que contempla maior número de patentes, seguido da nanotecnologia e indústria de biotecnologia. Nesses casos, a busca pelo uso de tecnologias limpas é fator determinante, já que a produção de substâncias de alta pureza exige a utilização de reagentes não-tóxicos e economicamente viáveis.

Os processos envolvendo fluidos supercríticos têm atraído especial atenção nas últimas décadas. Suas aplicações têm amplo alcance como em processos de extração, separação, fracionamento, reação e processamento de fármacos e polímeros (KALOGIANNIS; PANAYIOTOU, 2006). Particularmente, a tecnologia de fluidos supercríticos tem recebido recentemente grande atenção no campo da

formação de partículas de polímeros biodegradáveis, que podem ser usados como sistemas de liberação controlada de drogas e agentes bioativos. Diversos trabalhos estão disponíveis na literatura sobre o tema, mostrando as vantagens do uso dessa tecnologia, a exemplo do encapsulamento de partículas utilizando polímeros (YUE *et al.*, 2004), síntese de poliésteres (VARMA *et al.*, 2005), síntese de microesferas de poli(ácido láctico) (YOON *et al.*, 2007), síntese de poli(ácido láctico) catalisada por enzima (GARCÍA-ARRAZOLA *et al.*, 2009) e polimerização de  $\epsilon$ -caprolactona (LOEKER *et al.*, 2004; BERGEOT *et al.*, 2004; STASSIN; HALLEUX; JÉRÔME, 2001).

Além do uso da tecnologia supercrítica, o uso de enzimas *in vitro* para síntese de polímeros tem sido estudado ativamente na última década (VARMA *et al.*, 2005). A lipase constitui o grupo mais importante de biocatalisadores por ser facilmente obtida na natureza, apresentar alta seletividade e baixo impacto no meio ambiente. Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera (2009) apresentaram uma detalhada revisão a respeito da estabilidade de diversas enzimas em diferentes fluidos a altas pressões. Em destaque, a lipase, que foi estudada em dióxido de carbono (VIJA; TELLING; TOUGU, 1997; VARMA; MADRAS, 2008; HABULIN; KNEZ, 2001), propano (KNEZ; HABULIN; KRMELJ, 1998; HABULIN; KNEZ, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006) e butano (KNEZ; HABULIN; KRMELJ, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Além disso, reações químicas podem ser conduzidas utilizando lipase diretamente em meio orgânico (OLIVEIRA *et al.*, 2006), catalisando a polimerização através da abertura do anel de lactonas (pequenos e grandes anéis), diésteres cíclicos (lactídeos) e carbonatos cíclicos para produzir poliésteres ou policarbonatos (VARMA *et al.*, 2005).

Policaprolactona (PCL) é um dos mais atrativos poliésteres alifáticos para aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e compatibilidade com uma ampla faixa de polímeros (STASSIN; HALLEUX; JÉRÔME, 2001; PITT *et al.*, 1981; OLABISI; ROBESON; SHAW, 1979). Loeker *et al.* (2004) utilizaram a *Candida antarctica* lipase B (CAL-B) na produção de policaprolactona em dióxido de carbono supercrítico. Os autores mostraram que é possível obter produtos qualitativa e quantitativamente similares aos obtidos em reações catalisadas por catalisadores metálicos, que encerram uma grande desvantagem, a toxicidade. Os mesmos autores demonstraram que o uso de pressões muito altas e longo tempo de reação podem afetar a atividade da enzima. Assim, condições de processo mais brandas são essenciais para a otimização do processo.



Thurecht *et al.* (2006) investigaram a cinética da polimerização enzimática de  $\epsilon$ -caprolactona em dióxido de carbono supercrítico. Os autores concluíram que a cinética apresenta as mesmas características da cinética de polimerizações em tolueno.

O campo da síntese de policaprolactona em dióxido de carbono supercrítico catalisada por enzima ainda não conta com uma literatura vasta, podendo a área ser considerada incipiente. Os únicos trabalhos encontrados relacionados a este assunto, até o momento, foram os citados anteriormente. Por se tratar de um tema novo, muitas questões ainda não estão totalmente esclarecidas acerca do uso de enzima nesse meio reativo. A tentativa de avaliar seus efeitos na polimerização surge como desafio. É dentro desse contexto que este estudo objetiva investigar a produção de policaprolactona em dióxido de carbono supercrítico catalisada por enzima, uma lipase comercial, utilizando como parâmetros de avaliação da reação as massas molares obtidas na polimerização e o índice de polidispersão. Sabe-se também, que o desenvolvimento de um novo processo tecnológico deve primar pela viabilidade técnica e econômica.

Este estudo não teve a finalidade de avaliar economicamente o processo, detendo-se somente à pesquisa da viabilidade técnica. Portanto, estudou-se a atividade enzimática após a reação para verificar a possibilidade de reutilização da enzima em reações posteriores. Deseja-se assim, colaborar cientificamente com este campo do conhecimento, onde se verifica considerável lacuna no que se refere a publicações científicas.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O trabalho proposto tem como objetivo geral a produção de poli( $\epsilon$ -caprolactona), utilizando um catalisador enzimático, lipase comercial, em meio contendo dióxido de carbono à alta pressão.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a massa molar média numérica ( $\overline{M}_n$ ) e a ponderada ( $\overline{M}_w$ ) do polímero produzido e, a partir destes valores, calcular o índice de polidispersão ( $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ), como forma de caracterizar o produto obtido.
- Avaliar o efeito das variáveis que influenciam a reação de polimerização como: temperatura, pressão, quantidade de enzima, quantidade de água e agitação.
- Determinar a atividade enzimática da enzima comercial utilizada (Novozym 435<sup>®</sup>) com a finalidade de verificar o impacto das condições reacionais sobre a enzima.



## **3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 POLÍMEROS**

Os polímeros que ocorrem naturalmente, aqueles que estão presentes na natureza e são derivados de plantas e animais, têm sido utilizados pelo homem nas mais diversas aplicações por muitos séculos como na construção civil, na fabricação de utensílios e roupas, uso como medicamentos e fontes de energia. Esses materiais incluem a madeira, a borracha, o algodão, a lã, o couro e a seda. Outros exemplos de polímeros naturais são as proteínas, as enzimas, os amidos e a celulose, que desempenham importante papel em processos biológicos e fisiológicos, nas plantas e nos animais (CALLISTER, 2002).

As ferramentas modernas de pesquisa científica, como a cromatografia, técnicas de ressonância magnética nuclear e de espectrometria de massa, tornaram possível a determinação das estruturas moleculares deste grupo de materiais, bem como o desenvolvimento de numerosos polímeros, os quais são sintetizados a partir de moléculas orgânicas pequenas. Muitos dos plásticos, borrachas e materiais fibrosos que nos são úteis nos dias de hoje consistem em polímeros sintéticos. Os materiais sintéticos podem ser produzidos de maneira barata, e as suas propriedades podem ser aprimoradas num nível em que muitas delas são superiores às suas contrapartes naturais (CALLISTER, 2002).

#### **3.1.1 Classificação, estrutura e tipos de polímeros**

Os polímeros são formados pela repetição de um grande número de unidades químicas, chamadas *meros* ou unidades monoméricas. As cadeias poliméricas podem apresentar variações quanto à estrutura (linear, ramificada, com ligações cruzadas e em rede), tipo (homopolímeros e copolímeros), forma de obtenção (polímeros de condensação e polímeros de adição) e mecanismo de reação (polimerização em etapas e polimerização em cadeia). Quando os *meros* são ligados entre si formando uma unidade contínua, a cadeia é linear, quando as unidades são conectadas de forma tridimensional formando uma rede (ou mais redes unidas), o polímero é reticulado ou contém

ligações cruzadas; e quando uma cadeia possui ramificações laterais, o polímero é chamado de ramificado ou não-linear. A Figura 3.1 mostra as quatro formas básicas de estrutura molecular para a formação polimérica: linear, ramificada, cruzada e em rede (AKCELROUD, 2007).

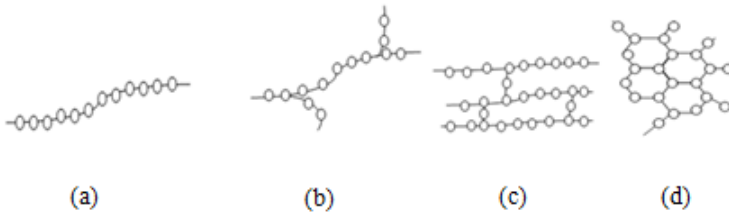


Figura 3.1. Representação esquemática de estruturas moleculares das cadeias poliméricas. (a) Lineares, (b) Ramificadas, (c) Com ligações cruzadas e (d) Em rede. Os círculos representam as unidades monoméricas que se repetem (CALLISTER, 2002).

Quanto ao número de monômeros envolvidos na formação da cadeia macromolecular, os polímeros podem ser classificados de duas maneiras: polímeros preparados a partir de um único monômero, que são chamados de homopolímeros; e polímeros em que dois ou mais monômeros são empregados, os copolímeros. Nestes últimos, as unidades monoméricas podem ser distribuídas randomicamente (copolímero randômico ou aleatório), de modo alternado (copolímero alternado), ou em blocos (copolímero em bloco) e, ainda, um polímero pode ramificar a cadeia de um outro polímero *graftzado* ou enxertado. A Figura 3.2 apresenta uma representação esquemática da classificação dos polímeros quanto aos monômeros envolvidos na sua formação (STEVENS, 1999; MANO; MENDES, 1999).

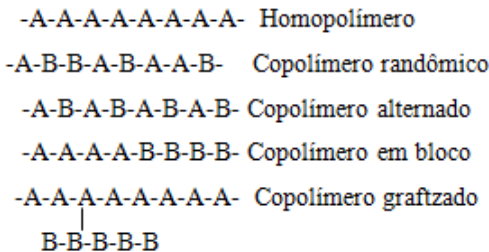


Figura 3.2. Representação esquemática de um homopolímero e de copolímeros (RAMOS, 2007).

Em 1929, Carothers propôs uma classificação dos polímeros em duas categorias: polímeros de condensação e polímeros de adição. Os polímeros de condensação são aqueles formados a partir de reações de condensação com eliminação de pequenas moléculas: água, ácido clorídrico ou metanol (por exemplo, formação de poliamidas, policarbonatos e poliuretano). Já os polímeros de adição são formados sem que haja saída de moléculas orgânicas, sendo a estrutura da unidade repetitiva idêntica àquela do monômero (por exemplo, poliestireno, polietileno e poli(cloreto de vinila)). A Figura 3.3 apresenta uma representação esquemática das reações para a obtenção de polímeros de condensação e de polímeros de adição (AKCELRUD, 2007).

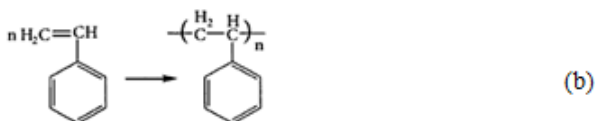
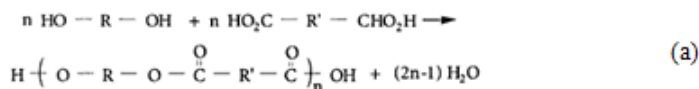


Figura 3.3. Representação das reações de polimerização: (a) Formação de poliéster por meio da policondensação entre um diol e um diácido, com eliminação de água. Se  $\text{R} = (\text{CH}_2)_2$  e  $\text{R}' = \text{fenila}$ , o poliéster formado é o poli(tereftalato de etileno). (b) Polimerização do estireno exemplificando a formação de um polímero de adição, em que  $n$  é o grau de polimerização do polímero resultante (AKCELRUD, 2007).

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 (STEVENS, 1999). Para evitar interpretação errônea, a classificação proposta por Flory (1953) surge baseada no mecanismo da reação, dividindo em duas classes de polímeros: polimerização em etapas (inclui todos os polímeros de condensação e aqueles formados por meio de etapas definidas) e polimerização em cadeia (essas reações requerem a formação de um centro ativo ao qual as moléculas de monômero adicionam-se para formar o polímero final). A Figura 3.4 mostra exemplos de polimerização em cadeia e de reação em etapas (AKCELRUD, 2007).

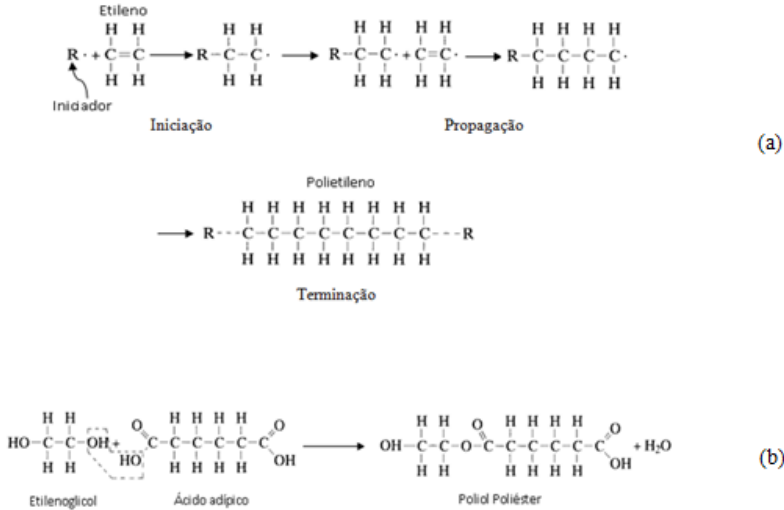


Figura 3.4. Tipos de polimerização. (a) Polimerização em cadeia para a formação de polietileno. Esse processo envolve três estágios distintos (iniciação, propagação e terminação), em que na iniciação uma espécie catalisadora reage com o monômero, formando um complexo ativo. Na propagação ocorre o crescimento linear da molécula à medida que unidades do monômero se fixam umas às outras em sucessão. A etapa de terminação se encerra quando as extremidades ativas de duas cadeias que se propagam reagem entre si, formando uma molécula não-reativa. (b) Reação em etapas representada pela formação de um poliálcool poliéster. O polímero é formado mediante reações intermoleculares entre o etilenoglicol e o ácido adípico, com eliminação de água (CALLISTER, 2002).

### 3.1.2 Massa molar e distribuição de massa

A característica mais importante dos polímeros é o seu tamanho molecular. A massa molar de um polímero não pode ser calculada como normalmente é feito com compostos puros de baixa massa molar. Os polímeros são formados por agrupamentos de moléculas de vários tamanhos, ou seja, exibem uma distribuição de massa molar e são denominados polidispersos. Portanto, a massa molar de um polímero é expressa como massa molar média (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Existem várias maneiras segundo as quais a massa molar média pode ser definida. A massa molar média pelo número de moléculas,  $\overline{M}_n$ ,



é obtida pela classificação das cadeias em uma série de faixas de tamanhos, seguida pela determinação da fração das cadeias que se encontram dentro de cada faixa de tamanho. Essa massa molar média pelo número de moléculas é expressa como:

$$\overline{M}_n = \sum x_i M_i \quad (3.1)$$

onde  $M_i$  representa a massa molar média da faixa de tamanhos  $i$ , e  $x_i$  representa a fração do número total das cadeias que se encontram dentro da faixa de tamanhos correspondente.

A massa molar média pelo peso,  $\overline{M}_w$ , se baseia na fração em peso das moléculas que se encontram dentro das várias faixas de tamanho. Ele é calculado de acordo com a relação:

$$\overline{M}_w = \sum w_i M_i \quad (3.2)$$

onde  $M_i$  representa a massa molar média dentro de uma faixa de tamanhos, enquanto  $w_i$  representa a fração em peso das moléculas dentro do mesmo intervalo de tamanhos (CALLISTER, 2002).

O grau de polimerização é o número de *meros* da cadeia polimérica, representado por DP (do inglês *degree of polymerization*). A expressão a seguir relaciona a massa molar do polímero como um todo,  $\overline{M}_n$ , com o grau de polimerização, DP, e a massa molar da unidade repetitiva,  $m_u$ .

$$\overline{M}_n = DP \cdot m_u \quad (3.3)$$

A mesma relação pode ser feita para  $\overline{M}_w$ :

$$\overline{M}_w = DP \cdot m_u \quad (3.4)$$

A distribuição da massa molar, ou polidispersão, é determinada a partir da razão ( $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ). Para amostras monodispersas, os valores de  $\overline{M}_n$  e  $\overline{M}_w$  são praticamente idênticos, e a polidispersão é igual à unidade (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

Quando se consideram métodos instrumentais para determinação da massa molar é importante distinguir aqueles que fornecem a massa molar absoluta daqueles métodos que necessitam calibração, utilizando-se padrões de massa molar conhecida. Métodos absolutos incluem medidas de propriedades coligativas para determinação de  $\overline{M}_n$  e técnicas de espalhamento de luz para determinação do  $\overline{M}_w$ . Métodos que requerem calibração incluem medidas de viscosidade em solução e cromatografia de exclusão por tamanho que fornece a distribuição da massa molar (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001) (esta última técnica está descrita no item 4.2.3).

### 3.1.3 Mercado de polímeros

No recente panorama internacional, onde se presencia o aumento relativo na integração entre políticas tecnológicas e de comércio internacional, algumas empresas dependem fortemente da geração de tecnologia para se sustentar. Este é o caso das empresas que compõem as indústrias químicas (na qual se insere o setor de polímeros) onde a tecnologia é parte indispensável da estratégia corporativa dessas empresas e fator determinante para promover mudanças nos níveis de competitividade.

A indústria de polímeros constitui hoje um dos pilares do estilo de vida contemporâneo. É enorme a quantidade de bens que nos cercam, produzidos de material polimérico, uma vez que eles são utilizados em quase todas as áreas das atividades humanas, principalmente nas indústrias automobilísticas, de embalagens, de revestimentos e de vestuário, e se incorporaram de forma permanente ao dia-a-dia de nossas vidas. Isso se deve também ao fato de que os materiais poliméricos vêm conquistando muitos mercados através da substituição de outros insumos, como papel, madeira e metais (HEMAIS; ROSA; BARROS, 2000).

Atualmente, o consumo *per capita* de plásticos no Brasil ainda é baixo, em comparação com países mais desenvolvidos. Ele gira em torno de 23 kg/habitante/ano, enquanto nos Estados Unidos e no Japão o consumo *per capita* supera 80 kg/habitante/ano. Pode indagar se, com maiores investimentos em P&D, o mercado poderia ser expandido. As pesquisas em inovação no campo dos polímeros se referem à obtenção de novas formulações, ganhos de produção e, principalmente, à adequação dos produtos para usos específicos. Em geral, as empresas brasileiras produzem a partir de licenciamento de tecnologia de

fornecedores estrangeiros. A grande maioria das pesquisas realizadas no Brasil na área de polímeros se encontra situada em universidades, não existindo vínculo direto com as atividades produtivas empresariais e, por conseguinte, não resulta em patentes ou rendimentos econômicos.

No entanto, com a expansão de mercado e o desenvolvimento econômico, produtos de maior valor agregado passaram a ser produzidos no país. Isto se deve, também, ao desenvolvimento da indústria brasileira de polímeros, matéria-prima do setor de transformação. Ao longo dos últimos trinta anos, a indústria de polímeros adquiriu um importante *status* em termos de produção, e hoje participa ativamente de diversos segmentos industriais, tais como têxteis, embalagens, eletroeletrônicos, automobilístico, etc. Entretanto, a quase totalidade dos polímeros produzidos e consumidos no Brasil são *commodities* ou *pseudo-commodities*, tais como polietileno, polipropileno, poliestireno, PVC e PET. (CERQUEIRA; HEMAIS, 2001).

### **3.2 A IMPORTÂNCIA DOS BIOPOLÍMEROS COMO BIOMATERIAIS**

Os biomateriais são materiais que têm a capacidade de interagir com tecidos naturais, podendo ser naturais ou sintéticos. Isto significa que no sentido mais amplo são enquadrados nesta categoria todos os materiais empregados na medicina, na odontologia, na medicina veterinária e na farmacologia. Além daqueles que entram na forma de implantes em contato direto com o tecido do corpo. Dessa forma, os biomateriais podem ser polímeros sintéticos, metais, cerâmicas e macromoléculas naturais que são manufaturados ou processados para se adequarem à utilização em dispositivos médicos que entram em contato íntimo com proteínas, células, tecidos, órgãos e sistemas orgânicos (JAHNO, 2005). Dentre os materiais utilizados como implantes, os polímeros apresentam grande potencial de uso, pois são, geralmente, fáceis de produzir, manusear e apresentam características semelhantes aos dos materiais biológicos (JAHNO, 2005).

Com a crescente preocupação da sociedade com os índices de poluição mundial, fez-se necessário o desenvolvimento de novos tipos de polímeros. Esses novos tipos de polímeros são chamados biopolímeros e podem ser definidos como qualquer polímero (proteína, ácido nucléico, polissacarídeo) produzido por um organismo vivo. A matéria-prima principal para a manufatura desses biopolímeros é uma fonte de carbono renovável, geralmente um carboidrato derivado de

plantios comerciais de larga escala como cana-de-açúcar, milho, batata, trigo e beterraba; ou um óleo vegetal extraído de soja, girassol, palma ou de outra planta oleaginosa (PRADELLA, 2006).

Esse desenvolvimento tecnológico aumentou a qualidade de vida e resultou na produção dos mais eficientes e sofisticados dispositivos médicos disponíveis no mercado hoje. A chave do sucesso de biomateriais a partir de polímeros é a relativa facilidade/baixo custo em que eles podem ser sintetizados com ampla faixa de propriedades como alta resistência mecânica, baixo atrito, dureza, elasticidade e funcionalidades como matéria-prima de próteses ortopédicas, implantes de tecido ósseo, cápsulas de comprimidos e materiais cirúrgicos. A grande variedade de reações envolvidas na ciência dos polímeros torna altamente desejável descobrir e desenvolver novas estratégias de síntese e gerar novos biomateriais poliméricos a partir dessas estratégias. Além disso, os recentes desenvolvimentos na engenharia de tecidos e sistemas de liberação de drogas têm renovado a busca por polímeros mais eficientes, biocompatíveis e biodegradáveis (KULSHRESTHA; MAHAPATRO, 2008).

### 3.2.1 Biodegradabilidade e biocompatibilidade

A biodegradação consiste na degradação dos materiais poliméricos através da ação de organismos vivos. Segundo estabelecido pela *American Standard for Testing and Methods* (2011), polímeros biodegradáveis são polímeros nos quais a degradação resulta primariamente da ação de microorganismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Em geral, derivam desse processo dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), metano ( $\text{CH}_4$ ), componentes celulares microbianos e outros produtos. A maioria dos compostos de alta massa molar que apresentam biodegradabilidade são poliésteres. Estes são polímeros contendo grupos funcionais ésteres em suas estruturas e são degradados por fungos através de hidrólise (ROSA *et al.*, 2002). As propriedades dos polímeros como a estrutura química e cristalinidade influenciam na taxa de degradação do polímero. Polímeros que possuem baixa cristalinidade, ou seja, a fase amorfa é maior na molécula, a taxa de degradação é maior, se degradando mais rápido devido à 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).

Biocompatibilidade significa que o material e seus possíveis produtos de degradação devem ser tolerados pelos tecidos envoltórios e não devem causar prejuízo ao organismo a curto e longo prazo. Atualmente, entende-se como biocompatibilidade a característica do material que, usado em aplicações específicas, desenvolve respostas teciduais adequadas aos sistemas hospedeiros (JAHNO, 2005).

Uma exigência para que um polímero seja usado em aplicações biomédicas é a sua biocompatibilidade, ou seja, a ausência de toxicidade. Já a biodegradabilidade é uma vantagem adicional, pois evita que o polímero tenha que ser removido depois de um período apropriado de implantação em um organismo vivo. Os polímeros poli( $\epsilon$ -caprolactona), poli(glicolídeos) e poli(lactídeos) são de grande interesse pois são hidroliticamente instáveis e degradam tanto *in vitro* como também *in vivo*, resultando no lançamento de subprodutos atóxicos, como produto de degradação (DUBOIS; JEROME; TEYSSIE, 1991 *apud* JAHNO, 2005).

### 3.3 POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)

A poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL), também chamada de poli(6-hidroxihexanoato) (P(6-HH)), é um poliéster sintético de cadeia linear que é de grande interesse para a área de biomateriais devido às suas propriedades mecânicas e sua biocompatibilidade (JELLINEK; KACHI, 1989; ANDRADE *et al.*, 2002 *apud* ALVES, 2008). A Figura 3.5 ilustra a poli( $\epsilon$ -caprolactona) em uma de suas formas de comercialização, como flocos semi-cristalinos de aproximadamente 3 mm de diâmetro.

Diversas aplicações biomédicas podem ser encontradas na literatura sobre policaprolactona e seus copolímeros: Darney *et al.* (1992) investigaram o uso de cápsulas de caprolactona contendo levonorgestrel em implantes de contraceptivo subcutâneo. Hattori *et al.* (2001) desenvolveram uma nova técnica para fixação de ossos utilizando fios de blenda de poli(l-ácido láctico) e poli( $\epsilon$ -caprolactona); Lemmouchi e Schacht (1997) investigaram o uso de copolímeros de  $\epsilon$ -caprolactona e d,l-dilactídeo em liberação controlada de medicamentos para tripanosomíase, uma doença que acomete frequentemente animais domésticos africanos (CASTRO, 2006); den Dunnem *et al.* (1997) investigaram o uso de copolímero l-dilactídeo, d-dilactídeo e  $\epsilon$ -caprolactona como biomaterial para reconstituição de nervos periféricos.

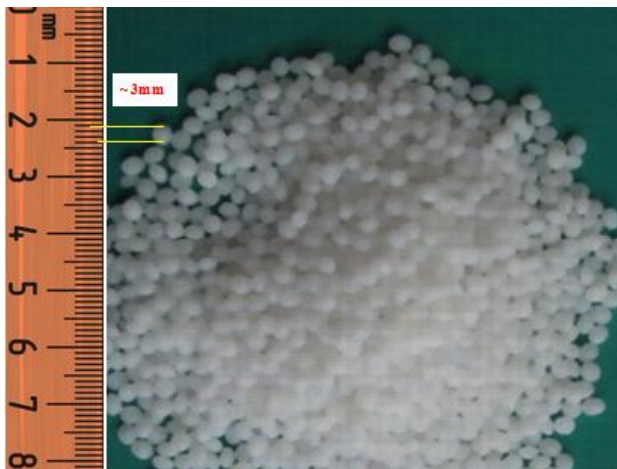


Figura 3.5. Fotografia em tamanho natural de flocos de poli( $\epsilon$ -caprolactona) de aproximadamente 3 mm de diâmetro e massa molar entre 70000 e 90000 g/gmol determinado por GPC. (BUSYTRADE.COM, 2010; SIGMA-ALDRICH, 2010).

Industrialmente, o custo de produção da poli( $\epsilon$ -caprolactona) não é muito elevado, uma vez que pode ser obtido por polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona (CL), um monômero relativamente barato, pela tradicional reação de oxidação Bayer-Villig a partir de ciclohexanona (ALVES, 2008). A Figura 3.6 mostra a estrutura química do monômero  $\epsilon$ -caprolactona e do polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona).

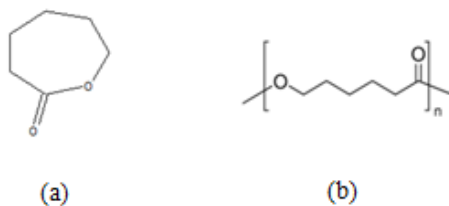


Figura 3.6. Estrutura química da  $\epsilon$ -caprolactona e poli( $\epsilon$ -caprolactona). (a) Estrutura química da  $\epsilon$ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular  $C_6H_{10}O_2$ . (b) Estrutura da poli( $\epsilon$ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a  $\epsilon$ -caprolactona, com o anel aberto (Sigma-Aldrich, 2010).

A PCL possui baixa temperatura de fusão (55 a 60 °C), é hidrofóbico e possui cristalinidade em torno de 50 %, além de possuir habilidade de formar blendas miscíveis com uma grande variedade de polímeros e ser solúvel em uma grande variedade de solventes orgânicos (ALVES, 2008). Bordes *et al.* (2010) estudaram a solubilidade de PCL's de diferentes massas molares em diversos solventes para a substituição do diclorometano em processos de microencapsulação. Os autores observaram também que a poli( $\epsilon$ -caprolactona) é solúvel em diversos solventes orgânicos.

Tradicionalmente, a PCL tem sido sintetizada por polimerização em massa, solução ou suspensão. Em qualquer destas técnicas é utilizado um iniciador organometálico na presença ou ausência de um co-iniciador contendo hidrogênio ativo (CASTRO, 2006).

Estudos sobre a polimerização por abertura de anel (ciclo-adição) da  $\epsilon$ -caprolactona (CL) foram concentrados principalmente na determinação de estruturas de centros ativos e nas relações entre as cinéticas de propagação e reações secundárias (como transesterificação inter ou intramolecular) (SLOMKOWSKI; SOSNOWSKI; GADZINOWSKI, 1998 *apud* CASTRO, 2006). Informações mais detalhadas sobre polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona estão no item 3.5.

A PCL sofre degradação microbiana e enzimática devido à suas ligações ésteres, passíveis à hidrólise, seguidas de cadeia alifática. No entanto, a taxa de degradação é bastante lenta (de 2 a 3 anos) em relação a outros polímeros biodegradáveis, como o PHB. A degradação da PCL foi 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).

### **3.4 MERCADO DE BIOPOLÍMEROS**

O mercado dos biopolímeros, exceto o da Goma Xantana, era da ordem de 60 mil toneladas em 2002 com preço de comercialização de US\$ 4/kg. Este mercado tem taxa de crescimento acima de 20 % ao ano e custos de produção decrescente para cerca de US\$ 2/kg, antevendo um consumo em 2015 da ordem 1 milhão ton/ano, perfazendo um mercado anual de US\$ 2 bilhões. É consenso entre as fontes consultadas que o preço de venda do produto é o obstáculo principal para sua entrada no

mercado, apontando-se um preço teto de cerca de US\$ 2/kg, ou seja, cerca de até 50 % superior aos preços de comercialização das resinas sintéticas mais comuns (PE, PP, PET). Não obstante, entre os anos 1990 e 2002 houve duplicação da demanda de bioplásticos a cada dois anos (BORSCHIVER; ALMEIDA; ROITMAN, 2008).

Uma análise da evolução do preço destes biopolímeros, levando-se em conta a curva de evolução tecnológica e do preço do petróleo em diversos cenários, demonstrou que os preços de polietileno tereftalato (PET) e bioplásticos convergiriam para cerca de US\$ 1/kg no ano de 2020, caso o petróleo subisse de US\$ 25 a US\$ 50/barril, cenário bastante provável na atual conjuntura. A Goma Xantana tem um mercado atual de cerca de US\$ 270 milhões e 40 mil ton/ano com taxa de crescimento acima de 5 % ao ano, perfazendo em 2015 um mercado de US\$ 400 milhões e 80 mil ton/ano) (PRADELLA, 2006).

### 3.5 LIPASES COMO CATALISADORES

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C. 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e ocorrem largamente na natureza onde elas catalisam a hidrólise de ésteres de gliceróis e cadeias longas de ácidos graxos, liberando moléculas de álcool e ácido. No entanto, foi observado que as lipases permanecem enzimaticamente ativas em solventes orgânicos e reagem no sentido inverso (na síntese de ésteres) (EISENMENGER; REYES-DE-CORCUERA, 2009).

O interesse industrial por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de engenharia de proteínas e enzimologia em meios não convencionais, as quais ampliaram consideravelmente o potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais (FIAMETTI, 2008).

Apresentam-se como vantagens a alta eficiência na conversão de substratos devido à sua alta seletividade para uma dada transformação orgânica e possibilidade de reciclagem do catalisador. As enzimas têm a habilidade de serem usadas na maioria dos meios reacionais (exemplos de meios reacionais alternativos incluem vários solventes orgânicos, misturas aquosas, misturas azeotrópicas e fluidos supercríticos), além de evitarem o uso de catalisadores potencialmente tóxicos (JUAIS, 2009). O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (CASTRO *et al.*, 2006). Certamente, a CAL-B, que é



a lipase de *Candida antarctica* – fração B (Figura 3.7), tem sido a lipase mais amplamente utilizada. Essa enzima tem uma característica chamada promiscuidade catalítica (COPLEY, 2003), que é a habilidade do sítio ativo da enzima em catalisar diferentes transformações químicas (JUAIS, 2009).

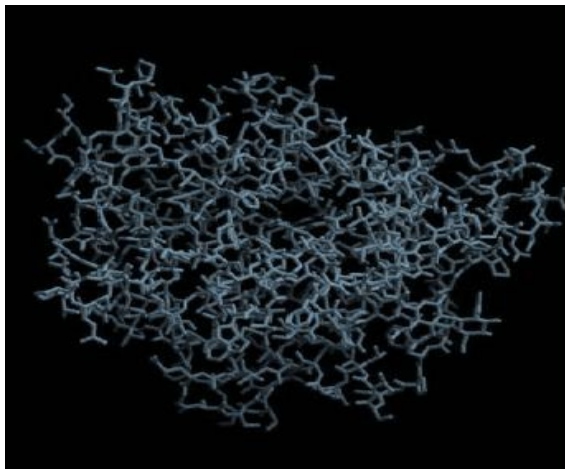


Figura 3.7. Estrutura tridimensional da CAL-B (Novozymes S.A., 2010).

Polímeros naturais como os polissacarídeos, proteínas, poliésteres são sintetizados na natureza por enzimas. O uso de enzimas para síntese de polímeros *in vitro* tem sido ativamente estudado na última década. Catálise enzimática tem fornecido uma nova estratégia sintética para a produção de polímeros. Por outro lado, os catalisadores organometálicos derivados de Zn, Al, Sn ou Ge podem ser tóxicos na natureza. Eles podem se concentrar na matriz remanescente depois da degradação do polímero (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008).

### 3.6 POLIMERIZAÇÃO POR ABERTURA DO ANEL “RING-OPENING POLYMERIZATION” (ROP)

A poli( $\epsilon$ -caprolactona) e seus copolímeros podem ser sintetizados quimicamente através do método da policondensação e do método da polimerização pela abertura do anel de ésteres cíclicos (lactonas, lactídeos e glicolídeos), o qual permite preparar poliésteres de elevada massa molar.

A utilização de enzimas como catalisador na polimerização por abertura de anel vem se tornando uma alternativa bastante atrativa (THURECHT *et al.*, 2006; LOEKER *et al.*, 2004), devido a polimerização ocorrer em condições mais amenas, principalmente no que concerne à temperatura (BENDER *et al.*, 2010). As lipases têm se mostrado efetivas na catálise de polimerizações por abertura do anel de lactonas, de lactídeos e de carbonatos cíclicos (THURECHT *et al.*, 2006), sendo a *Candida antarctica* lipase B a enzima mais aplicada (THURECHT *et al.*, 2006; LOEKER *et al.*, 2004).

Albertsson e Srivastava (2008) reportaram o mecanismo de polimerização de lactonas por abertura de anel descrito na Figura 3.8.

Na etapa de iniciação, a lipase faz um ataque nucleofílico no monômero, formando um complexo ativo com a enzima (EAM). A água presente no meio reativo, que se acredita estar presente na enzima, faz um ataque nucleofílico a esse complexo EAM, liberando a enzima e originando um polímero de cadeia curta, o ácido  $\omega$ -hidróxi-carboxílico. A etapa de propagação nada mais é do que o crescimento da cadeia do ácido  $\omega$ -hidróxi-carboxílico quando esse polímero faz sucessivos ataques nucleofílicos nos complexos ativos formados. A polimerização se encerra quando duas cadeias de polímeros reagem, tornando-se inativa (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008).

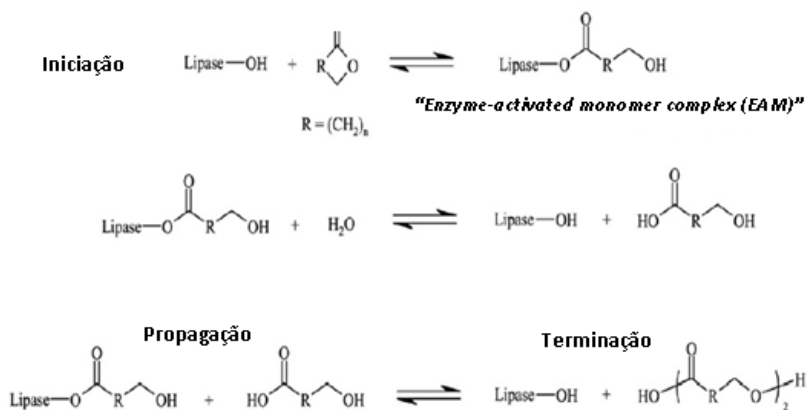


Figura 3.8. Mecanismo de polimerização de lactonas por abertura do anel. Na etapa de iniciação a lipase rompe o anel, formando um complexo ativo (EAM). Este complexo sofre ataque pela água, liberando a lipase e a unidade monomérica para a sequência de reações. Durante a propagação, o processo se repete até que, na etapa de terminação, duas unidades monoméricas reagem, encerrando a reação (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008).

O mecanismo da polimerização por abertura do anel também foi reportado por Thurecht *et al.* (2006) numa abordagem um pouco diferenciada. Os autores consideram, além da rota sugerida por Albertsson e Srivastava (2008), uma rota reacional que conduz à formação de oligômeros de cíclicos, conforme a Figura 3.9 a seguir.

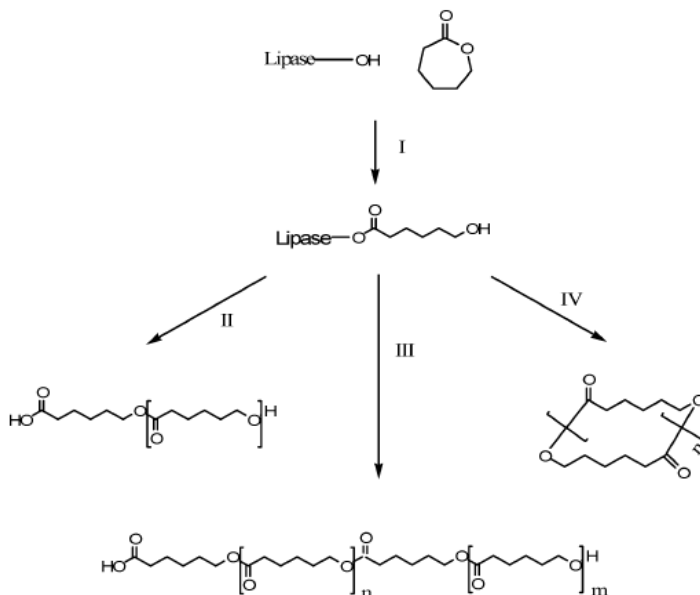


Figura 3.9. Esboço do mecanismo da polimerização enzimática da  $\epsilon$ -caprolactona e quatro rotas indicadas por I (formação do complexo ativo), II (formação do polímero), III (propagação do polímero) e IV (formação de oligômeros cíclicos) (THURECHT *et al.*, 2006). As rotas I, II e III seguem o mesmo desencadeamento do mecanismo apresentado por Albertsson e Srivastava (2008). A rota IV é aquela em que ocorre a formação de oligômeros quando o grupo éster do complexo é ativado e ocorre a reação entre esse grupo éster e o grupo hidroxila terminal da mesma cadeia, formando uma cadeia cíclica (THURECHT *et al.*, 2006).

### 3.7 FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

Um fluido supercrítico pode ser definido como uma substância para a qual ambas temperatura e pressão estão acima dos valores críticos (Figura 3.10).

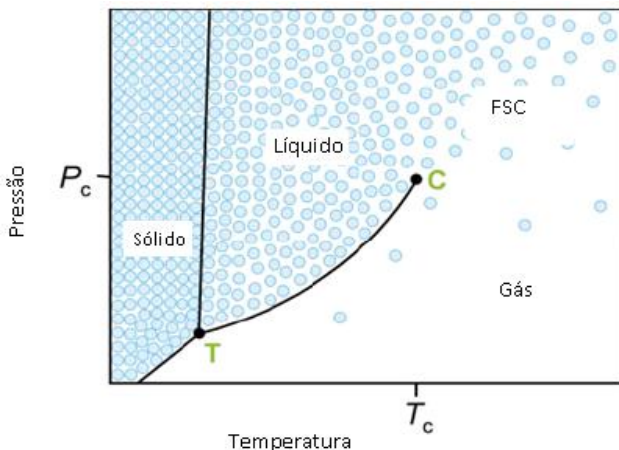


Figura 3.10. Diagrama P-T para um fluido puro (COOPER, 2000).

As vantagens do uso de fluidos comprimidos sobre os solventes líquidos como meios reacionais são bem discutidos na literatura. Estudos têm demonstrado que muitas reações podem ser conduzidas em dióxido de carbono supercrítico ou líquido e, em alguns casos, as taxas de reação e seletividades alcançadas são superiores aos obtidos em fase gasosa (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Em comparação aos solventes orgânicos usuais (hexano, diclorometano, benzeno, entre outros), 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).

O uso de dióxido de carbono supercrítico como solvente em catálise enzimática é de grande interesse devido à baixa polaridade do meio, podendo dissolver preferencialmente compostos hidrofóbicos. O dióxido de carbono supercrítico é considerado um solvente não polar (ANDRADE, 2008).

Knez e Habulin (2002) e Oliveira *et al.* (2006) avaliaram a estabilidade de lipases em dióxido de carbono supercrítico, em propano e em butano à alta pressão. A magnitude da pressão, temperatura e tempo de exposição necessário para afetar fortemente a atividade de

lipases depende da natureza e fonte da enzima e, principalmente, se a enzima está na sua forma nativa ou imobilizada (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Também foi observado que a maior perda enzimática ocorreu para o CO<sub>2</sub> supercrítico. Tal fato foi atribuído às interações enzima-solvente, conduzindo à formação de complexos covalentes com grupos amino livres na superfície da enzima para formar carbamatos, que resultaria na remoção de carga dos resíduos de histidinas, e assim poderia contribuir para a perda de atividade da enzima (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Entretanto, Knez e Habulin (2002) observaram que determinadas lipases, como lipases de *Candida antarctica*, *Candida rugosa* e *Pseudomonas fluorescens*, apresentam alta atividade e são estáveis em CO<sub>2</sub> supercrítico.



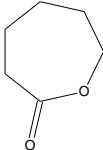
## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

As reações de polimerização à alta pressão em meio enzimático, as análises por GPC (*Gel Permeation Chromatography*) para a determinação da massa molar média numérica ( $\overline{M}_n$ ) e ponderada ( $\overline{M}_w$ ) dos polímeros produzidos, e por consequência o cálculo do índice de polidispersividade ( $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ); e os experimentos para a determinação da atividade enzimática foram realizados no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da Universidade Regional Integrada, Campus de Erechim/RS.

### 4.1 MATERIAIS

A lactona utilizada para as reações de polimerização era a  $\epsilon$ -caprolactona com 97 % de pureza, adquirida da Sigma-Aldrich com especificações indicadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1. Características da lactona estudada.

Lactona	Fórmula molecular	Massa molecular (g/gmol)	Estrutura molecular	Pureza (%)
$\epsilon$ -caprolactona	$C_6H_{10}O_2$	114,14		97

Fonte: Sigma-Aldrich, 2010.

O catalisador empregado era a lipase comercial imobilizada *Candida antarctica*, a Novozym 435<sup>®</sup>, fornecida pela Novozymes S/A e ilustrada na Figura 4.1. O dióxido de carbono (99,9 % de pureza) utilizado era adquirido da White Martins S/A. A atividade da Novozym 435<sup>®</sup> medida antes das reações era de 9661,72 U/g.



Figura 4.1. Amostra da enzima utilizada nas reações, lipase comercial imobilizada *Candida antarctica*, a Novozym 435<sup>®</sup>, fornecida pela Novozymes S/A.

Para a determinação da atividade enzimática era utilizado ácido láurico (Vetec, 98 % de pureza), álcool n-propílico (Synth, 99,5 % de pureza), acetona (Quimex, 99,5 % de pureza), álcool etílico (Quimex, 99,5 % de pureza) e hidróxido de sódio (Quimex 99,5 % de pureza).

Para as análises cromatográficas por GPC (*Gel Permeation Chromatography*) era utilizado tetraidrofurano (THF) (Vetec, 99 % de pureza) e padrões de poliestireno (Sigma-Aldrick, Fluka) de 500, 4000, 30000, 70000, 150000, 200000, 500000 e 1 milhão g/gmol.

## 4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### 4.2.1 Aparato experimental das reações de polimerização

O aparato experimental dos ensaios de polimerização à alta pressão está esquematizado na Figura 4.2 e a vista geral da unidade experimental na Figura 4.3. A montagem e o modo de operação da unidade de reação foram baseados nos trabalhos de Esmelindro *et al.* (2008) e Fiametti (2008). O sistema é composto de um reator encamisado de 50 mL de aço inoxidável (Parr Instrument Company, model 4843, Moline, IL, EUA) com agitação mecânica, um cilindro de dióxido de carbono e uma bomba seringa (Isco Inc., model 260D, Lincoln, EUA) conectada a um banho termostático.



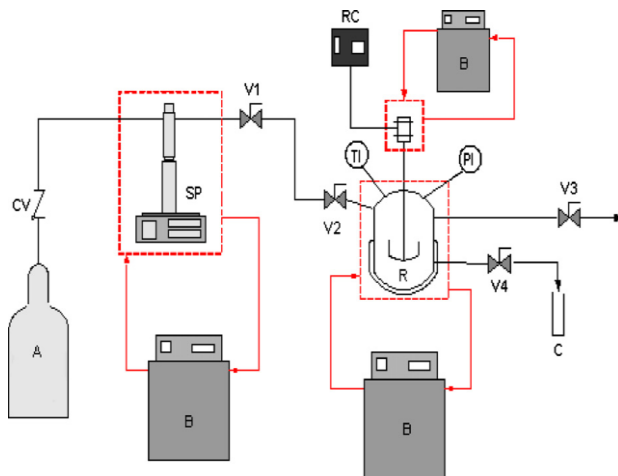


Figura 4.2. Diagrama esquemático do aparato experimental.

Fonte: Esmelindro *et al.* (2008).

No diagrama esquemático da unidade de reação (Figura 4.2), cada componente do sistema é indicado por siglas conforme apresentado a seguir: banho termostático (**B**), cilindro de dióxido de carbono (**A**), bomba seringa (**SP**), reator (**R**), indicador de temperatura (**TI**), indicador de pressão (**PI**), controlador do sistema de reação (**RC**), tubo coletor (**C**), válvula de retenção (**CV**) e válvulas esfera (**V1**, **V2**, **V3** e **V4**).

No procedimento experimental, inicialmente, a bomba (SP) era carregada com dióxido de carbono proveniente do cilindro reservatório (A) e o banho termostático (B) ligado para a manutenção da temperatura da bomba em 5 °C. Media-se a massa de  $\epsilon$ -caprolactona, da enzima e da água em balança analítica (Ohaus Analytical Standard, 0,0001 g de precisão) em quantidades especificadas no planejamento experimental e eram adicionados ao reator (R). A  $\epsilon$ -caprolactona era utilizada sem purificação prévia, medindo-se apenas o teor de água pelo método de Karl-Fischer (Mettler Toledo Model DL 50).

Em todos os experimentos a enzima era previamente ativada em estufa a 40 °C por 1 hora por ser a condição que possibilita maior atividade enzimática (FEIHRMANN, 2005). Em seguida, procedia-se o fechamento do reator (R), a conexão do sensor de temperatura, do agitador e da camisa de aquecimento. Depois de o sistema estar totalmente fechado, iniciava-se a pressurização da bomba de 10 em 10 bar até a pressão desejada. Enquanto isso, ajustava-se a temperatura do reator no controlador da reação (RC). O próximo passo consistia na

pressurização do reator pela abertura da válvula de alimentação (V2), mantendo o fluxo de dióxido de carbono baixo, até que todo o sistema estivesse pressurizado, ou seja, fluxo zero. As quantidades de  $\text{CO}_2$  e  $\epsilon$ -caprolactona necessárias para preencher o reator e manter a fração mássica de 4:1 de dióxido de carbono: $\epsilon$ -caprolactona eram previamente calculadas levando em consideração as densidades das substâncias puras.



Figura 4.3. Vista geral da unidade de reação. Da esquerda para a direita: a bomba seringa, o reator encaixado na manta de aquecimento e o controlador do reator.

Simultaneamente à pressurização, ajustava-se a velocidade de agitação, gradativamente, até a velocidade de interesse. Após a unidade de reação estar em funcionamento nas condições desejadas, iniciava-se o tempo de reação, que era de 2 horas para todos os ensaios. Este tempo de duas horas foi escolhido para proporcionar uma rápida resposta das condições para polimerização. Vale ressaltar que, durante o processo de pressurização, era verificado se havia ocorrência de vazamentos. Após o tempo de reação, dava-se início aos procedimentos de despressurização. Primeiramente, a bomba era despressurizada e em seguida, a camisa de aquecimento era removida e diminuía-se a velocidade de agitação. Para a despressurização do reator, abria-se a válvula de alívio (V3)

vagarosamente. A súbita abertura da válvula de alívio causava a danificação de componentes do aparato experimental. A liberação do solvente na condição em que o sistema estava homogêneo dentro do reator, conduzia a liberação da poli( $\epsilon$ -caprolactona) junto com o dióxido de carbono. Com a diminuição da pressão e, conseqüentemente da temperatura, a policaprolactona endurecia e obstruía as conexões e válvulas, impedindo a despressurização. O problema era evitado com a utilização de banho de gelo para o resfriamento do reator antes da abertura da válvula de alívio (V3). Seguindo esse procedimento, o sistema atingia pressões e temperaturas em que o sistema era imiscível, evitando que a poli( $\epsilon$ -caprolactona) fosse evacuada junto com o dióxido de carbono. Após a total despressurização do sistema, os sensores de temperatura e o agitador eram desconectados, possibilitando a abertura do reator. As amostras eram retiradas do reator com auxílio de uma espátula e armazenadas em frascos de amostragem com a massa previamente medida. Todas as reações eram realizadas na razão mássica entre solvente e monômero próximas a 4:1. A quantidade mássica da enzima era medida em relação à massa do monômero utilizada em cada ensaio assim como a de água, nos experimentos que incluíram água.

#### 4.2.2 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática era avaliada seguindo metodologia descrita em Oliveira *et al.* (2006), Fiametti (2008) e Krüger (2010). A quantificação ocorria por meio da reação de esterificação entre o ácido láurico e o álcool n-propílico na razão molar 3:1, à temperatura de 60°C com 5% (m/m) de enzima. A reação era conduzida em um reator de vidro aberto com agitação magnética cuja temperatura era mantida a 60°C com o auxílio de um banho termostático (Figura 4.4). Eram retiradas alíquotas de 150  $\mu$ L, em triplicata, do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e eram diluídas em 20 mL da solução acetona/etanol 1:1. A quantidade de ácido láurico consumido era determinada pela titulação de hidróxido de sódio 0,01N. Uma unidade de atividade (U) é determinada como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1  $\mu$ mol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas.

A determinação da atividade enzimática da Novozym 435<sup>®</sup> de cada reação era realizada em triplicata.



Figura 4.4. Sistema composto de um banho termostático e reatores de vidro utilizados para a determinação da atividade enzimática.

A seguinte equação foi empregada para o cálculo da atividade da lipase:

$$A_E = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3 \times V_f}{t \times M_E \times V_e} \quad (4.1)$$

onde:

$A_E$  = atividade enzimática ( $\mu\text{mol}$  de ácido/ $\text{min} \cdot M_E$  ou  $\text{U/g}$ );

$V_a$  = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra no tempo zero ( $\text{mL}$ );

$V_b$  = volume de hidróxido de sódio gasto na titulação da amostra após o tempo  $t$  ( $\text{mL}$ );

$M$  = molaridade da solução de hidróxido de sódio ( $\text{mmol/mL}$ );

$V_f$  = volume final do meio reacional ( $\text{mL}$ );

$t$  = tempo de reação ( $\text{min}$ );

$M_E$  = massa de enzima utilizada na reação ( $\text{g}$ );

$V_e$  = volume da alíquota do meio reacional retirada para titulação ( $\text{mL}$ );

$1\text{U} = 1 \mu\text{mol}$  de ácido/minuto.

Para o cálculo da perda ou ganho da atividade enzimática, a seguinte relação era utilizada:

$$\text{Perda ou ganho de } A_E (\%) = \frac{A_E \text{ após a reação}}{A_E \text{ antes da reação}} \times 100 \quad (4.2)$$

### 4.2.3 Análises por GPC (Gel Permeation Chromatography)

Para a determinação da massa molar média numérica ( $\overline{M}_n$ ) e ponderada ( $\overline{M}_w$ ) e o cálculo do índice de polidispersidade ( $\overline{M}_w/\overline{M}_n$ ) eram utilizados os valores obtidos das análises de GPC (*Gel Permeation Chromatography*) para os polímeros resultantes das reações enzimáticas. Essa técnica, também chamada de SEC (*Size Exclusion Chromatography*), consiste no fracionamento das cadeias poliméricas de um polímero. O princípio de fracionamento da GPC envolve a separação do polímero a ser analisado em número muito grande de frações com diferentes massas molares. Essa separação ocorre quando uma solução é bombeada de uma coluna recheada com um gel poroso. Este gel possui uma porosidade de dimensões conhecidas, permitindo às cadeias poliméricas a entrarem nos poros, excluindo as cadeias maiores que então contornam as partículas. Ao penetrarem nestes poros, as cadeias menores percorrem um caminho maior que as cadeias maiores, atrasando-se em relação a estas. Ao final da coluna de separação, cadeias de massa molar maior serão eluídas primeiro, sendo seguidas pelas cadeias menores (CASTRO, 2006).

Para as análises cromatográficas era utilizado um sistema modular HPLC AGILENT 1100 Series (Califórnia, EUA) (Figura 4.5) com injetor automático (G1313A ALS), degaseificador (DEGASSER G1379A), bomba quaternária (G1311A), operando em modo isocrático, trocador de calor (G1316A) e detector por índice de refração (G1362A RID). A coluna utilizada era a Bimodal – Agilent Zorbax PSM 6,2 x 250 mm. O volume de amostra injetado era de 20  $\mu\text{L}$  e a fase móvel utilizada era tetraidrofurano (THF) (Vetec, 99 % de pureza) com fluxo de 0,5 mL/min e temperatura fixa da coluna de 30 °C. A calibração era realizada com padrões de poliestireno. Todas as soluções dos padrões, assim como o THF utilizado, eram analisados por HPLC (*High Performance Liquid Chromatography*) nas mesmas condições das determinações das amostras e as impurezas não apresentaram interferências significativas para a detecção em índice de refração.



Figura 4.5. Cromatógrafo HPLC AGILENT 1100 Series utilizado nas análises por GPC.

#### 4.2.4 Planejamento experimental

A técnica de planejamento de experimentos é uma ferramenta estatística que permite determinar as variáveis que exercem maior influência em um determinado processo, assim como avaliar possíveis inter-relações entre variáveis de um processo. Além disso, esta ferramenta também permite otimizar o sistema em estudo, com o objetivo de minimizar ou maximizar uma resposta. A principal vantagem da utilização desta ferramenta é a redução do número de experimentos e a consequente redução de custos (RODRIGUES e IEMMA, 2005).

Para avaliar a influência das variáveis de processo na produção enzimática de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em  $\text{CO}_2$  à alta pressão foram realizados dois planejamentos fatoriais, totalizando 22 experimentos. O primeiro planejamento experimental foi o fatorial fracionado  $2^{4-1}$  e o segundo foi um planejamento fatorial completo  $2^3$ . As variáveis de processo e os níveis empregados em cada variável estão na Tabela 4.2. O binômio temperatura/pressão foi investigado de forma a manter a densidade do dióxido de carbono aproximadamente constante (0,53

$\text{g/cm}^3$ ). A quantidade de enzima foi calculada em relação à massa do monômero utilizada, assim como a quantidade de água adicionada ao reator.

Os níveis das variáveis investigadas no primeiro planejamento foram baseados em experimentos realizados na literatura (LOEKER *et al.*, 2004). As altas pressões (83, 114, 145, 150, 175 e 200 bar) correspondem a regiões de homogeneidade entre o solvente e o monômero estudadas por Bender *et al.* (2010). Um teste adicional foi realizado junto ao primeiro planejamento experimental com o propósito de observar o efeito do aumento da pressão de 145 para 180 bar.

O segundo planejamento foi elaborado a partir das observações e do resultado da análise estatística do primeiro planejamento. Além disso, no segundo planejamento a temperatura e a agitação foram mantidas constantes em 65 °C (temperatura ótima da enzima) e 200 rpm. Os resultados foram analisados com o auxílio do software Statística 8.0 Statsoft Inc<sup>®</sup>.

Tabela 4.2. Níveis das variáveis investigadas nos planejamentos experimentais.

Variáveis	Primeiro planejamento experimental		
	Níveis		
	-1	0	+1
Binômio Temperatura (°C)/Pressão (bar) <sup>a</sup>	35/83	50/114	65/145
Quantidade de enzima (% m/m)	1	5,5	10
Quantidade de água adicionada (% m/m)	0	1	2
Agitação (rpm)	200	300	400
Variáveis	Segundo planejamento experimental		
	Níveis		
	-1	0	+1
Pressão (bar)	150	175	200
Quantidade de enzima (% m/m)	5	10	15
Quantidade de água adicionada (% m/m)	0	2	4

<sup>a</sup> O binômio temperatura/pressão foi escolhido para manter a densidade do CO<sub>2</sub> aproximadamente constante em 0,53  $\text{g/cm}^3$ , com exceção do teste adicional em que a densidade era 0,66  $\text{g/cm}^3$ .





## **5 RESULTADOS E DISCUSSÕES**

Esta seção apresenta os resultados obtidos da produção de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) em dióxido de carbono à alta pressão catalisada pela lipase comercial Novozym 435<sup>®</sup>. A discussão será focada nos resultados da análise por GPC e na influência das variáveis de processo na massa molar dos polímeros obtidos.

### **5.1 REAÇÕES DE POLIMERIZAÇÃO**

A Tabela 5.1 mostra as condições de processo e os resultados das análises por GPC para a massa molar numérica e ponderada e o índice de polidispersão (IP) obtidos para o primeiro planejamento experimental. A Tabela 5.1 apresenta também o resultado do balanço de massa ou massa recuperada calculada com o material coletado do reator.

Tabela 5.1. Resultados do primeiro planejamento para a produção de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em CO<sub>2</sub> à alta pressão catalisada por lipase.

Experimento	Binômio T/P <sup>a</sup> (°C)/bar	Densidade do CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	Enzima (m/m%)	Água adicionada (m/m%)	Agitação (rpm)	Massa recuperada <sup>b</sup> (%)	Mn (g·gmol <sup>-1</sup> )	Mw (g·gmol <sup>-1</sup> )	IP
1	35/(83 ± 3)	0,56	1	0	200	n.p. <sup>d</sup>	- <sub>c</sub>	- <sub>c</sub>	- <sub>c</sub>
2	65/(145 ± 3)	0,53	1	0	400	n.p. <sup>d</sup>	123,5	125,6	1,02
3	35/(83 ± 3)	0,56	10	0	400	n.p. <sup>d</sup>	- <sub>c</sub>	- <sub>c</sub>	- <sub>c</sub>
4	65/(145 ± 3)	0,53	10	0	200	100	3893,2	7639,6	1,96
5	35/(83 ± 3)	0,56	1	2	400	n.p. <sup>d</sup>	- <sub>c</sub>	- <sub>c</sub>	- <sub>c</sub>
6	65/(145 ± 3)	0,53	1	2	200	n.p. <sup>d</sup>	125,1	126,6	1,01
7	35/(83 ± 3)	0,56	10	2	200	96,19	1252,6	1867,7	1,49
8	65/(145 ± 3)	0,53	10	2	400	92,77	2105,6	3129,2	1,49
9	50/(114 ± 3)	0,54	5,5	1	300	91,16	1050,4	1176,5	1,12
10	50/(114 ± 3)	0,54	5,5	1	300	93,93	2064,5	3023,2	1,46
11	50/(114 ± 3)	0,54	5,5	1	300	93,45	2555,9	3957,1	1,55
<b>Teste adicional</b>									
12	65/180	0,66	10	0	200	79,22	7419,6	14550,0	1,96

<sup>a</sup>O binômio temperatura/pressão está relacionado à densidade aproximadamente constante do CO<sub>2</sub>. <sup>b</sup>A massa recuperada é a massa do produto obtido após a polimerização calculada pela relação: massa recuperada = [(massa do produto de reação/massa de entrada (monômero + enzima + água (se adicionada)))]x100. <sup>c</sup> Amostra insuficiente para análise ocasionado por perda devido a problemas na despressurização. <sup>d</sup> n.p.: não ocorreu a polimerização.

O polímero de maior massa molar obtido foi o experimento 12 (7419,6 g/gmol). O experimento foi um teste adicional da variação da pressão do experimento 4 de 145 para 180 bar, para verificar o que ocorreria com a massa molar do polímero obtido. A condição 4 foi escolhida por ser o polímero de maior massa molar do planejamento (3893,2 g/gmol, Figura 5.1).

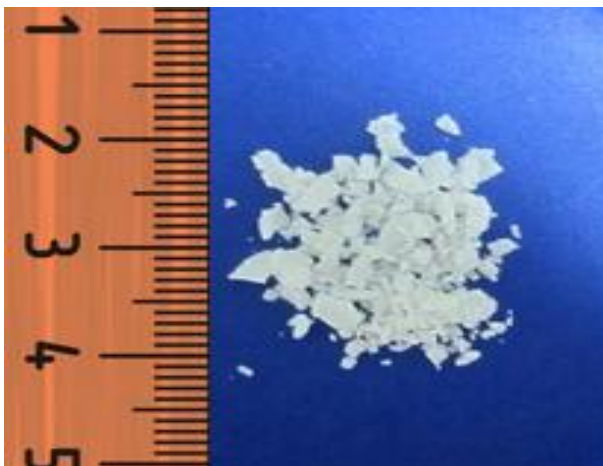


Figura 5.1. Poli( $\epsilon$ -caprolactona) produzida no primeiro planejamento experimental a 65 °C, 145 bar, 10 % de enzima, 200 rpm de agitação e sem adição de água.

Já nos experimentos 2 e 6 não houve formação de polímero, o produto de reação obtido apresentou-se como um líquido de aspecto similar ao monômero. Além disso, a baixa massa molar (123,5 e 125,1 g/gmol, respectivamente) é comparável com a massa molar da  $\epsilon$ -caprolactona (114,14 g/gmol).

As massas recuperadas nas reações, apresentadas na Tabela 5.1, ficaram numa média de 94 % em relação à massa de entrada (monômero, enzima e, em alguns experimentos, água). Esse resultado indica que a perda foi mínima, visto os problemas encontrados na despressurização do sistema (vide item 4.2.1). Além disso, esse resultado também indicou que o rendimento das reações foram altos nas condições avaliadas, ou seja, houve maior conversão do monômero. O alto rendimento implicou na formação de maior número de cadeias poliméricas de diferentes tamanhos, aumentando a polidispersão. O fator que também contribuiu para polidispersividades mais altas, além do alto rendimento, são as reações que ocorrem paralelamente às reações

para a formação da poli( $\epsilon$ -caprolactona) com a formação de oligômeros cíclicos, reportado no item 3.6).

Em relação à massa molecular dos polímeros produzidos, os obtidos neste trabalho foram menores do que aqueles obtidos por Loeker *et al.* (2004). Um fator que pode ter influenciado nesta menor eficiência é o tempo de reação. Enquanto neste trabalho foi utilizado um tempo total de 2 horas de reação, os autores citados empregaram ensaios com tempo de reação de 6 a 72 horas. O melhor resultado alcançado por eles foi em reações de 24 horas com a obtenção de um polímero com massa molar de 30000 g/gmol. Este tempo de duas horas foi escolhido para proporcionar uma rápida resposta das melhores condições para polimerização, já que foi observado por outros autores (BERGEOT *et al.*, 2004) que em reações acima de 2 horas, o rendimento decresce e a polidispersividade aumenta por causa da formação de oligômeros, conforme citado no parágrafo anterior. No entanto, tempos mais longos de reação podem ser estudados através de cinéticas a serem realizadas por outros colaboradores de nosso grupo de pesquisa.

A respeito da influência das condições de processo na formação de PCL quanto à massa molar foi realizada uma análise estatística através do diagrama de Pareto, em que os níveis foram avaliados para o intervalo de confiança de 90 % ( $p = 0,10$ ). O diagrama de Pareto (Figura 5.2) mostra que apenas a quantidade de enzima foi estatisticamente significativa para a faixa de condições de processo estudadas.

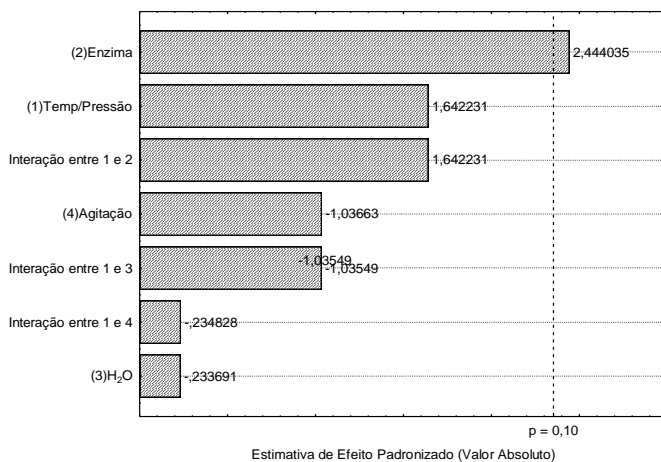


Figura 5.2. Diagrama de Pareto para a massa molar média numérica do primeiro planejamento experimental com nível de significância de 90 %.

Loeker *et al.* (2004) observaram que temperaturas mais baixas não favorecem a formação de PCL de cadeias grandes. Os polímeros de maiores massas molares obtidos por tais autores foi a 50 e 65 °C e os de menores, a 35 °C. Os polímeros de maiores massas molares (experimento 4 com 3893,2 g/gmol e o experimento 12 com 7419,6 g/gmol) obtidos nesse estudo também foram à 65°C, estando de acordo com a literatura. Bergeot *et al.* (2004) também verificaram um aumento na massa molar com o aumento da temperatura.

A  $\epsilon$ -caprolactona é praticamente insolúvel em dióxido de carbono a baixas pressões, assim, o conhecimento do diagrama de fases entre  $\epsilon$ -caprolactona e dióxido de carbono é fundamental para saber a região de solubilidade desse sistema. Para as reações de polimerização, trabalhar dentro da região de solubilidade permite que haja uma maior interação entre o monômero e a espécie iniciadora da reação, permitindo o monômero se difundir rapidamente para o sítio ativo no crescimento das cadeias do polímero (LOEKER *et al.*, 2004). Bender *et al.* (2010) investigaram o equilíbrio de fases de diversos sistemas de lactonas em dióxido de carbono em ampla faixa de pressão. A Figura 5.3 mostra o diagrama de fases para o sistema  $\epsilon$ -caprolactona e dióxido de carbono obtido pelos autores para diferentes condições de temperatura, pressão e fração molar de  $\text{CO}_2$ .

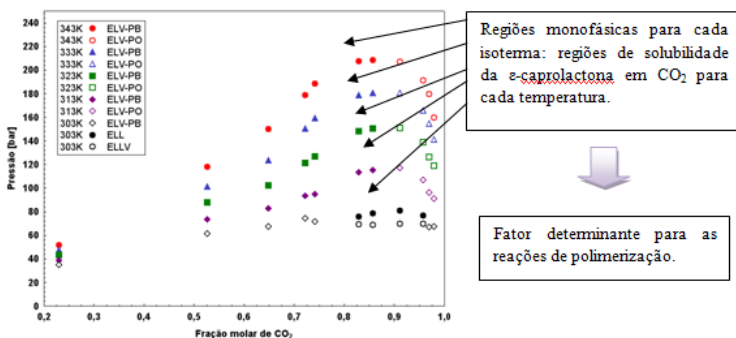


Figura 5.3. Diagrama P-x-y para o sistema binário  $\text{CO}_2$  (1) +  $\epsilon$ -caprolactona (2) (BENDER *et al.*, 2010).

O gráfico, na Figura 5.3, mostra as regiões de solubilidade, que são as regiões indicadas acima de cada isoterma e os tipos de transição de fases envolvidos. Ainda no gráfico, é possível observar que à medida que as isotermas e as frações de  $\text{CO}_2$  aumentam, a pressão de transição

também é aumentada devido a um aumento na energia interna com o aumento da temperatura. Logo, significa que é necessária uma pressão maior para que o sistema apresente-se totalmente miscível (BENDER *et al.*, 2010).

A discussão detalhada sobre o comportamento de fases de  $\epsilon$ -caprolactona em CO<sub>2</sub> não é o foco principal desse trabalho, contudo pode ser encontrada nos trabalhos de Bender *et al.* (2010), Xu *et al.* (2002) e Bergeot *et al.* (2004).

As pressões adotadas neste trabalho (83, 114, e 145 bar no primeiro planejamento, 150, 175 e 200 bar no segundo planejamento e para o teste adicional, 180 bar) foram escolhidas de forma que a  $\epsilon$ -caprolactona seja solúvel em dióxido de carbono. A região de miscibilidade entre  $\epsilon$ -caprolactona e o dióxido de carbono supercrítico é alcançada em pressões mais elevadas (acima de 80 bar). Embora a miscibilidade do sistema seja favorável à ocorrência da polimerização por facilitar a interação entre o solvente e o monômero, ela não é determinante. Um exemplo disso é que os experimentos 1, 3 e 5 foram realizados numa pressão de 83 bar e não foi verificada formação de polímero. No entanto, as reações que produziram polímero de maior massa molar foram aquelas conduzidas em pressões mais elevadas, de 114 e 145 bar. O aumento do rendimento e da massa molar do polímero obtido para o experimento 12 com o aumento da pressão de 145 bar para 180 bar também foi observado.

Essa não polimerização dos experimentos 1, 3 e 5 pode estar relacionada às outras condições de processo e à interação entre elas. Os fatores que determinam a formação de polímero ou não, ainda é alvo de investigação dos grupos de pesquisa. Thurecht *et al.* (2006) relataram que condições ótimas para a polimerização enzimática da  $\epsilon$ -caprolactona em dióxido de carbono supercrítico são alcançadas pela descoberta do balanço entre o poder de solubilização do solvente e a melhor temperatura para a atividade da enzima.

Loeker *et al.* (2004) e Bergeot *et al.* (2004) também obtiveram PCL's de maiores massas molares em pressões mais elevadas.

Os resultados da Tabela 5.1 mostraram que a formação de PCL de massas molares maiores (3893,2 g/gmol no experimento 4 e 7419,6 g/gmol no experimento 12 ocorreu quando foi utilizado 10 % (m/m) de enzima. O diagrama de Pareto, na Figura 5.2, confirma esse resultado, por indicar a quantidade da enzima como uma variável significativa (para o nível de 90 % de significância). Loeker *et al.* (2004) também

encontraram massas molares maiores (35000 g/gmol) com a utilização de 10 % (m/m) de enzima.

O conteúdo de água na polimerização de  $\epsilon$ -CL também foi alvo de investigação. De acordo com o mecanismo apresentado no trabalho de Albertsson e Srivastava (2008), a água participa como iniciador da reação ao fazer um ataque nucleofílico ao complexo formado quando a lipase age no monômero. Dessa forma, a polimerização irá responder de forma diferente de acordo com a quantidade de água adicionada. Segundo Thurecht *et al.* (2006), existe uma relação inversa entre a massa molar e quantidade de água, e quantidades mais baixas de água conduzem a formação de polímeros de massas molares maiores. Neste trabalho, os polímeros de maiores massas molares foram obtidos sem adição de água (experimento 4 e 12), enquanto que os polímeros de massas molares menores tiveram adição de água, com quantidades indicadas na Tabela 5.1. Thurecht *et al.* (2006) também obtiveram polímero de maior massa molar quando não houve adição de água no sistema.

Os trabalhos disponíveis na literatura sobre polimerização de poli( $\epsilon$ -caprolactona) à alta pressão em meio enzimático não relataram observações relacionadas à velocidade de agitação, rendimento e massa molar.

Como o diagrama de Pareto indicou a significância de apenas uma variável (nível de 90 % de significância) no primeiro planejamento, a quantidade de enzima, os níveis do segundo planejamento foram deslocados na tentativa de observar as outras variáveis que possam ser estatisticamente significativas. Nesse planejamento, a temperatura foi fixada em 65 °C por estar na região ótima da enzima (aproximadamente 70 °C de acordo com as especificações técnicas fornecida pela Novozymes S/A). Além disso, a agitação também foi fixada (200 rpm) para evitar a possibilidade de quebra das partículas de polímero em formação em agitações mais altas. Além disso, não foi verificada relação entre a velocidade de agitação e produção de polímero.

A Tabela 5.2 mostra as condições de processo e os resultados das análises por GPC para massa molecular numérica e ponderada e o índice de polidispersão (IP) obtidos para os ensaios do segundo planejamento experimental. A Tabela 5.2 apresenta também o resultado do balanço de massa ou massa recuperada calculada com o material coletado do reator.

Tabela 5.2. Resultados do segundo planejamento experimental da produção de policaprolactona em CO<sub>2</sub> à alta pressão catalisada por lipase<sup>a</sup>.

Experimento	Pressão (bar)	Densidade do CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	Enzima (m/m%)	Água adicionada (m/m%)	Massa recuperada (%)	Mn (g·gmol <sup>-1</sup> )	Mw (g·gmol <sup>-1</sup> )	IP
<b>1</b>	150 ± 3	0,55	5	0	n.p <sup>b</sup>	71,2	72,6	1,02
<b>2</b>	200 ± 3	0,69	5	0	86,78	1394,4	1831,9	1,31
<b>3</b>	150 ± 3	0,55	15	0	n.p <sup>b</sup>	-	-	-
<b>4</b>	200 ± 3	0,69	15	0	92,94	1463,3	2046,5	1,39
<b>5</b>	150 ± 3	0,55	5	4	n.p <sup>b</sup>	123,9	125,7	1,01
<b>6</b>	200 ± 3	0,69	5	4	n.p <sup>b</sup>	80,0	81,3	1,02
<b>7</b>	150 ± 3	0,55	15	4	76,59	1148,0	1361,7	1,19
<b>8</b>	200 ± 3	0,69	15	4	84,83	1099,5	1195,1	1,09
<b>9</b>	175 ± 3	0,64	10	2	n.p <sup>b</sup>	82,0	83,80	1,02
<b>10</b>	175 ± 3	0,64	10	2	n.p <sup>b</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
<b>11</b>	175 ± 3	0,64	10	2	88,27	1263,4	1463,3	1,16

<sup>a</sup> Temperatura: 65 °C e agitação: 200 rpm. <sup>b</sup> n.p.: não ocorreu a polimerização. <sup>c</sup> Amostra insuficiente para análise ocasionado por perda devido a problemas na despressurização do sistema.



O diagrama de Pareto para o segundo planejamento experimental (Figura 5.4) não mostrou nenhuma variável significativa dentro da faixa de estudo para o nível de 90 % de significância.

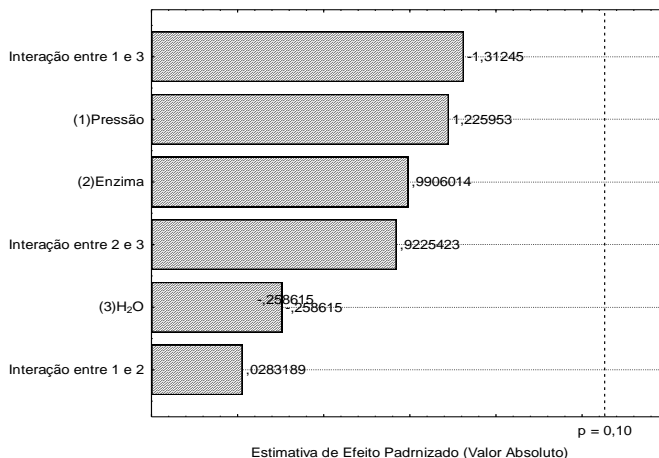


Figura 5.4. Diagrama de Pareto para a massa molar média numérica do segundo planejamento (nível de 90 % de significância).

Para este segundo planejamento, a maior massa molar foi a obtida no experimento 4, Figura 5.5, com 1463,3 g/gmol para 200 bar, 15 % de enzima, nenhuma adição de água, agitação de 200 rpm e temperatura de 65 °C. Observa-se que o aumento da pressão e da quantidade de enzima gerou polímeros de massas molares menores em relação ao primeiro planejamento. A princípio, isso parece contrariar a discussão realizada acerca do planejamento anterior em que polímeros de maiores massa molares foram produzidos em pressões mais altas.

Isso pode ser elucidado com a observação do conteúdo de água inicial do monômero utilizado em cada um dos planejamentos. No segundo planejamento, o conteúdo de água do monômero era de 2,5 % enquanto no planejamento anterior era de 1,5 %. A água, além de atuar como um iniciador, tem um efeito deletério na produção de poli( $\epsilon$ -caprolactona), ou seja, ela interrompe a polimerização, impedindo a propagação da cadeia e a obtenção de polímero de massa molar menor devido à formação de polímeros de cadeias mais curtas (Thurecth, *et al.*, 2006). O item 3.6 reporta informações mais detalhadas a respeito do mecanismo de reação. A polidispersidade apresentou valores baixos, confirmando a formação de polímeros de cadeias similares e

consequentemente de massas molares médias menores.

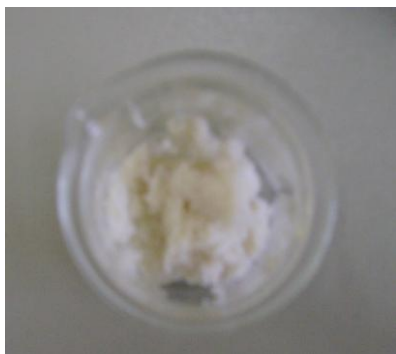


Figura 5.5. Poli( $\epsilon$ -caprolactona) produzida no segundo planejamento experimental a 65 °C, 200 bar, 15 % de enzima, 200 rpm de agitação e sem adição de água.

As massas recuperadas ficaram numa média de 86 % em relação às massas de entrada (monômero, enzima e, em alguns experimentos, água). Ao comparar com as massas recuperadas no primeiro planejamento (94 %), é verificado que no segundo planejamento houve uma maior perda (14 %) do que no primeiro planejamento (6 %). Os motivos para a maior perda no segundo planejamento estão relacionados principalmente ao problema da depressurização do reator. Esse resultado também indicou que o rendimento das reações foi alto nas condições avaliadas. As baixas massas molares obtidas justificam o alto rendimento das reações por não apresentarem uma relação linear entre si (Thurecht *et al.* 2006). O mecanismo proposto no trabalho de Thurecht *et al.* (2006) (Figura 3.9) sugere uma possível explicação para essa não linearidade entre a massa molar e conversão do monômero: a existência de outras reações que não conduzem a formação do polímero. Isso significa que durante a reação ocorre a conversão do monômero, mas essas conversões não conduzem necessariamente à formação de polímeros de altas massas molares. Como mostrado no mecanismo de Thurecht *et al.* (2006), a conversão do monômero pode conduzir tanto a formação de cadeias poliméricas grandes como de oligômeros.

## 5.2 ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Os resultados das análises de atividade enzimática, determinada conforme descrito no item 4.2.2, são apresentados nas Tabelas 5.3 e 5.4,

que correspondem ao primeiro e segundo planejamentos experimentais, respectivamente.

Não foram encontrados na literatura estudos relacionados à atividade enzimática após a produção de policaprolactona em CO<sub>2</sub> supercrítico catalisada por lipase. Observou-se, no entanto, trabalhos que avaliaram a atividade de lipases em diferentes fluidos à alta pressão, como o de Oliveira *et al.* (2006), de Eisenmenger e Reyes-De-Corcuera (2009), Knez e Habulin (2002) e Feihrmann (2005).

A atividade da Novozym 435<sup>®</sup> medida antes das reações foi de 9661,72 U/g. A partir daí é possível discutir se a atividade da enzima diminuiu, aumentou ou se permaneceu a mesma, uma vez que atividade enzimática pode ser consideravelmente afetada pela temperatura e pressão (OLIVEIRA *et al.* 2006; KNEZ e HABULIN, 2002).

Oliveira *et al.* (2006) mostraram que quando a Novozym 435<sup>®</sup> é submetida ao dióxido de carbono a altas pressões ocorre perda da atividade numa média de 5,2 %. Segundo os autores, essa perda pode estar diretamente relacionada às interações enzima-solvente, conduzindo a formação de complexos covalentes com grupos amino livre na superfície da enzima para formar carbamatos, que resultaria na remoção de carga da histidina, e assim poderia contribuir para a perda da atividade enzimática. Isso justifica a perda da atividade enzimática detectada nas reações 2, 4, 6, e 12 do primeiro planejamento deste trabalho (Tabela 5.3) devido à exposição à pressão de 145 bar, e 180 bar para o experimento 12, por 2 horas. O ensaio 10 apresentou atividade enzimática discordante dos demais pontos centrais (9 e 11). Os experimentos 9 e 11 apresentaram perda da atividade (13,57 % e 3,18 %, respectivamente) enquanto que o experimento 10 apresentou ganho de atividade enzimática (16,58 %). Ao checar o desvio padrão da atividade enzimática para este experimento ( $11263,98 \pm 2198,83$ ), é possível dizer que houve erro da análise, ocasionando a interpretação inadequada do resultado.

Tabela 5.3. Atividade enzimática após as reações realizadas no primeiro planejamento experimental.

Experimento	Binômio T/P (°C)/bar	Densidade do CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	Enzima (m/m%)	Água adicionada (m/m%)	Agitação (rpm)	Atividade enzimática (U/g)	<sup>a</sup> Perda/Ganho de atividade (%)
1	35/83	0,56	1	0	200	<sub>b</sub>	<sub>b</sub>
2	65/145	0,53	1	0	400	7892,31 ± 258,81	Perda de 18,31
3	35/83	0,56	10	0	400	<sub>b</sub>	<sub>b</sub>
4	65/145	0,53	10	0	200	7283,11 ± 269,07	Perda de 24,62
5	35/83	0,56	1	2	400	<sub>b</sub>	<sub>b</sub>
6	65/145	0,53	1	2	200	6713,29 ± 1661,45	Perda de 30,52
7	35/83	0,56	10	2	200	7783,42 ± 1914,33	Perda de 19,44
8	65/145	0,53	10	2	400	12453,25 ± 839,05	Ganho de 28,89
9	50/114	0,54	5,5	1	300	8350,61 ± 323,37	Perda de 13,57
10	50/114	0,54	5,5	1	300	11263,98 ± 2198,83	Ganho de 16,58
11	50/114	0,54	5,5	1	300	9354,07 ± 33,83	Perda de 3,18
12	65/180	0,66	10	0	200	751,634 ± 670,14	Perda de 92,22

<sup>a</sup> A perda ou ganho de atividade enzimática considera a atividade enzimática da Novozym 435<sup>®</sup> medida antes das reações, 9661,72 U/g, e a relação indicada no item 4.2.2, equação 4.2. <sup>b</sup> Amostra insuficiente para análise.

O diagrama de Pareto apresentado na Figura 5.6 mostra que nenhuma variável foi significativa para a faixa de condições estudadas. A agitação e água mostraram uma tendência maior a influenciar o processo do que as demais variáveis.

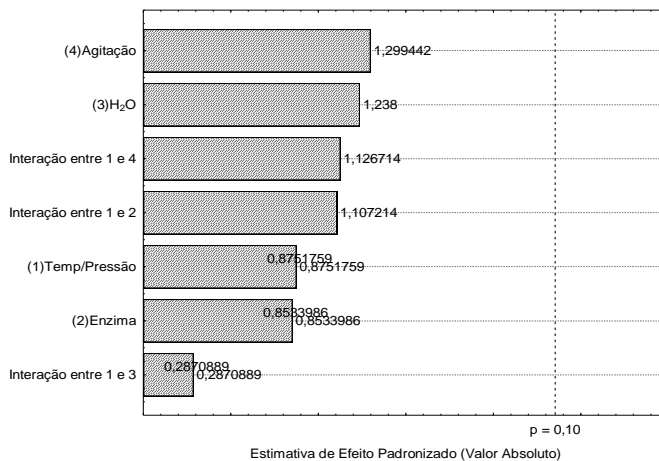


Figura 5.6. Diagrama de Pareto para a atividade enzimática do primeiro planejamento no nível de 90 % de significância.

Na Tabela 5.4 estão apresentados os resultados de atividade enzimática após as reações do segundo planejamento experimental.

Tabela 5.4. Atividade enzimática após as reações do segundo planejamento experimental<sup>a</sup>.

Experimento	Pressão (bar)	Densidade do CO <sub>2</sub> (g/cm <sup>3</sup> )	Enzima (m/m%)	Água adicionada (m/m%)	Atividade enzimática (U/g)	<sup>b</sup> Perda/Ganho de atividade (%)
<b>1</b>	150	0,55	5	0	460,32 ± 134,69	Perda de 95,24
<b>2</b>	200	0,69	5	0	1284,92 ± 237,02	Perda de 86,70
<b>3</b>	150	0,55	15	0	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
<b>4</b>	200	0,69	15	0	7381,74 ± 231,22	Perda de 23,60
<b>5</b>	150	0,55	5	4	534,67 ± 82,98	Perda de 94,47
<b>6</b>	200	0,69	5	4	480,45 ± 107,24	Perda de 95,03
<b>7</b>	150	0,55	15	4	10347,59 ± 365,53	Ganho de 7,10
<b>8</b>	200	0,69	15	4	3251,23 ± 673,84	Perda de 66,35
<b>9</b>	175	0,64	10	2	1490,85 ± 271,63	Perda de 84,57
<b>10</b>	175	0,64	10	2	- <sup>c</sup>	- <sup>c</sup>
<b>11</b>	175	0,64	10	2	8347,02 ± 2462,09	Perda de 13,61

<sup>a</sup> Temperatura: 65°C e agitação de 200 rpm. <sup>b</sup> A perda ou ganho de atividade enzimática considera a atividade enzimática da Novozym 435<sup>®</sup> medida antes das reações, 9661,72 U/g, e a relação indicada no item 4.2.2, equação 4.2. <sup>c</sup> Amostra insuficiente para análise.

Observa-se, de forma geral, que houve uma maior perda na atividade enzimática para o segundo planejamento quando comparado com o primeiro. A perda de atividade da enzima, considerando somente os ensaios em que houve perda, foi de 69,56 % no segundo planejamento e 13,10 % no primeiro planejamento. A Figura 5.7 mostra o diagrama de Pareto para a atividade enzimática avaliada para o segundo planejamento.

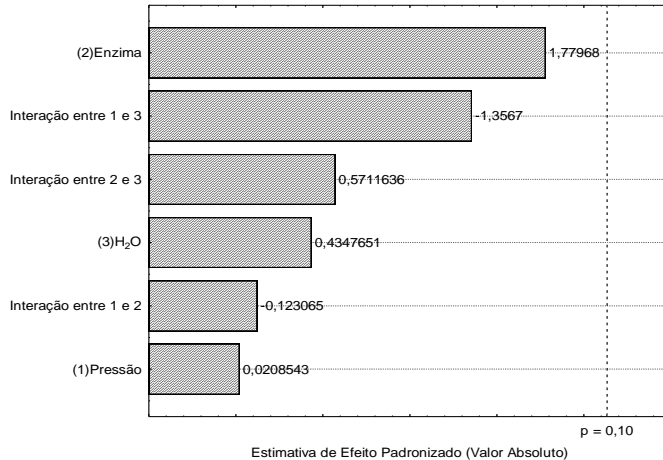


Figura 5.7 Diagrama de Pareto para a atividade enzimática do segundo planejamento no nível de 90 % de significância.

Observa-se pela Figura 5.7 que a enzima foi a variável que mostrou maior tendência a ser significativa ao nível de 90% de significância. A quantidade de água e o binômio pressão/água, apesar de não serem significativas, apresentaram uma influência negativa sobre a atividade enzimática. Uma vez que a umidade inicial do monômero no segundo planejamento foi maior do que no primeiro. O excesso de água facilita a agregação da enzima e pode causar um decréscimo na sua atividade (FEIHRMANN, 2005). Esta pode ter sido uma das razões que ocasionaram grandes perdas de atividade em alguns experimentos. Além disso, no segundo planejamento as pressões eram maiores (150 a 200 bar). Assim, como demonstrado por Oliveira *et al.* (2006) a perda de atividade pode ser devida ao contato da enzima com o dióxido de carbono a altas pressões.





## 6 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

### 6.1 CONCLUSÕES

A área de produção de biopolímeros está crescendo cada vez mais com o uso de técnicas menos agressivas ao ambiente. A produção de poli( $\epsilon$ -caprolactona) em CO<sub>2</sub> à alta pressão catalisada por lipase é um tema ainda pouco explorado pela comunidade científica, Isso faz desse trabalho um estudo promissor e com grande contribuição para a comunidade científica. O objetivo de produzir policaprolactona por via enzimática à alta pressão foi satisfatoriamente alcançado. Entretanto, estabelecer controle sobre a polimerização é ainda um desafio devido às diferentes variáveis que influenciam no sistema. Os dados de equilíbrio de fases do sistema  $\epsilon$ -caprolactona e dióxido de carbono foram fundamentais para o desenvolvimento desse estudo. A importância dessa área do conhecimento se deveu à possibilidade de investigação das melhores condições reacionais. As observações verificadas nesse estudo estiveram em concordância com as relatadas na literatura. As maiores massas molares foram obtidas para altas pressões (até 200 bar) e grande quantidade de enzima (até 15 %). Enquanto o grande conteúdo de água (até 4 %) aparentemente teve um efeito deletério para a polimerização. Com relação à temperatura, os melhores resultados foram obtidos na faixa de temperatura ótima da enzima (65 °C). Dentre as condições estudadas, o polímero de maior massa molar (7419,6 g/gmol) foi obtido a 65 °C, 180 bar, 10 % de enzima com 200 rpm de agitação e sem adição de água. No que diz respeito à atividade enzimática após a polimerização observou-se um efeito negativo de altas quantidades de água e altas pressões sobre a atividade enzimática após as reações.

### 6.2 SUGESTÕES

Baseando-se nos resultados obtidos no presente trabalho, algumas sugestões podem ser enumeradas como forma de aprimoramento do tema:

- Emprego de outras enzimas;
- Emprego de outros fluidos pressurizados;
- Avaliar o efeito da variação da proporção entre  $\epsilon$ -caprolactona e dióxido de carbono sobre a polimerização;

- Estudar a cinética de reação;
- Estudar os oligômeros formados durante a polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona.

## REFERÊNCIAS

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

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

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

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

AMERICAN STANDARD FOR TESTING AND MATERIALS, D883. **Standard Terminology Relating to Plastics**. Annual Book of ASTM Standards, 2011.

BENDER, J. P.; FEITEN, M.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. **Phase behavior of binary systems of lactones in carbon dioxide**. *Journal of Chemical Thermodynamics*, v. 42, p. 48-53, 2010.

BERGEOT, V.; TASSAING T.; BESNARD M.; CANSSELL F.; MINGOTAUD A. F. **Anionic ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in supercritical carbon dioxide: parameters influencing the reactivity**. *Journal of Supercritical Fluids*, n.28, p.249-261, 2004.

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

- BORSCHIVER, S; ALMEIDA, L. F. M.; ROITMAN, T. **Monitoramento Tecnológico e Mercadológico de Biopolímeros.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.18, n. 3, p. 256-261, 2008.
- BUSYTRADE.COM. **Polycaprolactone.** Disponível em: <http://www.busytrade.com/selling-leads/1532098/Sell-Polycaprolactone.html> Acesso: 12 de dezembro de 2010.
- CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.** 5ed. LTC, São Paulo, 2002.
- CASTRO, M. L. **Copolímeros estatísticos biodegradáveis de  $\epsilon$ -caprolactona e l,l-dilactideo – Síntese, caracterização e propriedades.** 2006. 150p. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo.
- CERQUEIRA, V.; HEMAIS, C. A. **Estratégia Tecnológica e a Indústria Brasileira de Transformação de Polímeros.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.11, n.3, 2001.
- COOPER, A. I. **Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide.** Journal of Materials Chemistry, v. 10, p.207-234, 2000.
- COPLEY, S. D. **Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity.** Current Opinion in Chemical Biology, v. 7, p.265, 2003.
- DARNEY, P. D.; KLAISLE C. M.; MONROE, S. E.; COOK, C. E. PHILLIPS, N. R.; SCHINDLER, A. **Evaluation of a 1-year levonorgestrel-releasing contraceptive implant-side-effects, release rates and biodegradability.** Fertility and Sterility, v.58, n.1, p137143, 1992.
- den DUNNEN, W. F. A.; SCHAKENRAAD, J. M.; ZONDER-VAN, G. J.; PENNING, A. J.; VAN DER LEI, B.; ROBINSON, P. H. **A new PLLA/PCL copolymer for nerve regeneration.** Journal of Materials Science Materials Medicine, v.4, p.521-525, 1993.

EISENMENGER, M. J.; REYES-DE-CORCUERA, J. I. **High Pressure Enhancement of Enzymes: A review.** Enzyme and Microbial Technology, n.45, p.331-347, 2009.

ESMELINDRO, A. F. A.; FIAMETTI, K. G.; CENI, G.; CORAZZA, M. L.; TREICHEL, H.; OLIVEIRA, D.; OLIVEIRA, J. V. **Lipase-catalyzed production of monoglycerides in compressed propane and AOT surfactant.** The Journal of Supercritical Fluids, n. 47, p.64-69, 2008.

FEIHRMANN, A. C. **Avaliação da atividade enzimática de lipases imobilizadas em fluidos pressurizados.** 2005. 78p. Dissertação – Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Departamento de Ciências Agrárias, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – Campus de Erechim, Rio Grande do Sul.

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

FLORY, P.J. **Principles of polymer chemistry.** Cornell University Press, Ithaca, N.Y., 1953.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. **Polímeros Biodegradáveis – Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos.** Química Nova, v. 29, n. 4, p.811-816, 2006.

GARCÍA-ARRAZOLA, R., LÓPEZ-GUERRERO, D. A., GIMENO, M.; BÁRZANA, E. **Lipase-catalyzed synthesis of poly-L-lactide using supercritical carbon dioxide.** Journal of Supercritical Fluids, 2009.

GREGOROWICZ, J. **Phase Behavior of Lactide in Supercritical Carbon Dioxide at High Pressures.** Journal of Supercritical Fluids, n.46, p.105-111, 2008.

HABULIN, M.; KNEZ, Z. **Pressure stability of lipases and their use in different systems.** Acta Chimica Slovenica, 2001, n.48, p.521–32, 2001.

- HATTORI, K.; TOMITA, N.; YOSHIKAWA, T.; TAKAKURA, Y. **Prospects for Bone fixation – development of new cerclage fixation techniques.** Materials Science & Engineering, v.17, p.27-32, 2001.
- HEMAIS, C. A.; ROSA, E. O. R.; BARROS, H. M. **Observações sobre o Desenvolvimento Tecnológico e os Ciclos da Indústria de Polímeros no Brasil.** Polímeros: Ciência e Tecnologia, v.10, n.3, p.149-154, 2000.
- JAHNO, V. D. **Síntese e caracterização do poli(l-ácido láctico) para uso como biomaterial.** 2005. 79p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.
- JELLINEK, H. H. G.; KACHI, H.; **Degradation and stabilization of polymers,** v.2, Elsevier, USA, 1989.
- JUAIS, D. Produção de **Polímeros Derivados de Fontes Renováveis via Catálise Enzimática.** 2009. 116p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.
- KALOGIANNIS, C. G.; PANAYIOTOU, C. G. **Bubble and cloud points of the system poly( $\epsilon$ -caprolactone) + carbon dioxide + dichloromethane or chloroform.** Journal of Chemical Engineering Data, v.51, p.107–111, 2006.
- KNEZ, Z.; HABULIN, M. **Compressed gases as alternative enzymatic-reaction solvents: a short review.** Journal of Supercritical Fluids, v.23, p.29-42, 2002.
- KNEZ, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases.** Journal of Supercritical Fluids, v.14, p.17–29, 1998.
- KOBAYASHI, S.; MAKINO, A. **Enzymatic Polymer Synthesis: An opportunity for Green Polymer Chemistry.** Chemical Reviews, n.109, p.5288-5353, 2009.

KRÜGER, R. L. **Produção de mono e diacilgliceróis a partir da glicerólise enzimática de óleo de oliva**. 2010. 131p. Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina.

KULSHRESTHA, A.; MAHAPATRO, A. **Polymers for Biomedical Applications**, 2008.

LEMMOUCHI, Y.; SCHACHT, E. **Preparation and *in vitro* evaluation of biodegradable poly( $\epsilon$ -caprolactone-co-D,L-lactide(X-Y)) devices containing trypanocidal drugs**. Journal of Controlled Release, v.45, p.227-233, 1997.

LOEKER, F. C.; DUXBURY, C. J.; KUMAR, R.; GAO, W.; GROSS, R.; HOWDLE, S. M. **Enzyme-catalyzed Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in supercritical carbon dioxide**. Macromolecules, n.37, p.2450-2453, 2004.

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.

MANO, E. B.; MENDES, L. C. **Introdução a Polímeros**, 2ed., Editora Edgard Blücher Ltda, São Paulo, 1999.

OLABISI, O.; ROBESON, L. E.; SHAW, M. T. **Polymer-Polymer Miscibility**; Academic Press: New York, 1979.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, A.C.; RUBIRA, A. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. **Influence of compressed fluids treatment on the activity of *Yarrowia lipolytica* lipase**. Journal of Molecular Catalyses B: Enzymatic, n. 39, p.117–23, 2006.

PITT, C.G.; CHASALOW, F.I.; HIBIONADA, Y.M.; KLIMAS, D.M.; SCHINDLER, A. **Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly( $\epsilon$ -caprolactone) *in vivo***. Journal of Applied Polymer Science, v. 26, n.11, p. 3779-3787, 1981.

PRADELLA, J. G. C. - “**Biopolímeros e Intermediários Químicos**”, Relatório Técnico nº 84396-205, Centro de Tecnologia de Processos e Produtos, Laboratório de Biotecnologia Industrial – LBI/CTPP (2006).

RAMOS, J. C. **Polímeros quirais: Polipirróis e poliofenos modificados com R-(-) ou S-(+)-N-(3,5-Dinitrobenzoil)- $\alpha$ -fenilglicina**. 2007. 96p. Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos: uma estratégia sequencial de planejamentos**, Casa do Pão Editora Campinas, SP, , 2005.

ROSA, D. S.; CHUI, Q. S. H.; FILHO, R. P.; AGNELLI, J. A. M. **Avaliação da Biodegradação de Poli-b-(Hidroxibutirato), Poli-b-(Hidroxibutirato-co-valerato) e Poli- $\epsilon$ -(caprolactona) em Solo Compostado**. Polímeros, v.12, n.4, São Carlos, Oct./Dec. 2002.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com). Acesso: 12 de dezembro de 2010.

STASSIN, F.; HALLEUX, O.; JÉRÔME, R. **Ring-opening Polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide**. Macromolecules, n. 34, 775-781, 2001.

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

Tabela de Especificações Técnicas para a Novozym 435<sup>®</sup>. Disponível em [www.novozymes.com.br](http://www.novozymes.com.br).

THURECHT, K. J.; HEISE, A.; DEGEUS, M.; VILLARROYA, S.; ZHOU, J.; WYATT, M. F.; HOWDLE, S. M. **Kinetics of Enzymatic Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide**. Macromolecules, n.39, p.7967-7972, 2006.

van DAM, J. E. G.; KLERK-ENGELS, B.; RABBINGE, R. **Securing Renewable Resource Supplies for Changing Market Demands in a Bio-based Economy**. Industrial Crops and Products, n.21, p.129, 2005.



VARMA, I. K.; ALBERTSSON, A. C.; RAJKHOWA, R.; SRIVASTAVA, R. K. **Enzyme Catalyzed Synthesis of Polyesters.** Progress in Polymer Science, n.30, p.949-981, 2005.

VARMA, M. N.; MADRAS, G. **Kinetics of synthesis of butyl butyrate by esterification and transesterification in supercritical carbon dioxide.** Journal of Chemical Technology Biotechnology, n.283, p.1135-44, 2008.

VIJA, H.; TELLING A.; TOUGU, V. **Lipase-catalysed esterification in supercritical carbon dioxide and in hexane.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, n.7, p.259-62, 1997.

XU, Q.; WAGNER, K.-D.; DAHMEN, N. **Vapor-liquid equilibria of different lactones in supercritical carbon dioxide.** Journal of Supercritical Fluids, v. 26, p. 83 – 93, 2003.

YOON, C. S.; PARK, H. D.; KIM, S. Y.; KIM, S. Y. **High Molecular Weight Poly(L-lactide) and its Microsphere Synthesized in the Supercritical Dimethyl Ether.** Macromolecular Symposia, p.249-250, p.515-520, 2007.

YUE, B.; YANG, J.; WANG, Y.; HUANG, C.; DAVE, R.; PFEFFER, R. **Particle encapsulation with polymers via in situ polymerization in supercritical CO<sub>2</sub>.** Powder Technology, v.146, p.32-45, 2004.