

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA – USP/EEL

Cintia Maria Rodrigues Rosa

Síntese e caracterização de partículas poliméricas à base de estireno com propriedades magnéticas para utilização como matriz de imobilização de enzimas

Lorena
 2019

CINTIA MARIA RODRIGUES ROSA

Síntese e caracterização de partículas poliméricas à base de estireno com propriedades magnéticas para utilização como matriz de imobilização de enzimas

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química na área de Concentração em Desenvolvimento de Produtos e Processos

Orientador: Prof^a. Dr^a. Larissa de Freitas

Versão Corrigida

Lorena
2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Rosa, Cintia Maria Rodrigues

Síntese e caracterização de partículas poliméricas à base de estireno com propriedades magnéticas para utilização como matriz de imobilização de enzimas. / Cintia Maria Rodrigues Rosa; orientadora Larissa de Freitas - Versão Corrigida. - Lorena, 2019. 130 p.

Dissertação (Mestrado em Ciências - Programa de Pós Graduação em Engenharia Química na Área de Desenvolvimento de Produtos e Processos) - Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo. 2019

1. Biocatalisador. 2. Polimerização em suspensão. 3. Partículas magnéticas. 4. Suporte polimérico à base de estireno. 5. Imobilização de lipase. I. Título. II. Freitas, Larissa de, orient.

*Dedico este trabalho aos meus pais
por sempre confiarem e apoiarem minhas decisões e sonhos*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por iluminar meu caminho e ter me concedido forças e capacidade para chegar até aqui.

Aos meus pais, Márcia e Giovani, meu irmão e minha cunhada, Guilherme e Walquíria, pelo amor incondicional e incentivo em todos os momentos.

À Prof^ª. Dr^ª. Larissa de Freitas, minha orientadora. Obrigado pela orientação, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pelos ensinamentos, conversas, atenção, muita paciência e confiança em meu trabalho.

Às Prof^ª. Dr^ª. Heizir Ferreira de Castro e Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Da Rós e ao Prof. Dr. Leandro Gonçalves de Aguiar, pelas inúmeras contribuições ao trabalho, pela disponibilidade e apoio.

Aos meus queridos amigos Mariane Pereira, Wallyson Ribeiro, Cláudia Salim, Tayara Correia, Caio Henrique e Antonio Merladet, por me manter confiante em minhas escolhas.

Às amigas e segunda família, Taciana Freire, Saniele Bindandi, Viviane Lima, Samara Cardoso e Amanda Bahia, por tornarem meus dias mais leves e me ensinarem que as diferenças podem ser muito engraçadas.

A todos os professores e funcionários da Escola de Engenharia de Lorena que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho.

Aos amigos de laboratório que me acompanharam e me ajudaram nesta etapa: Dr^a. Ana Karine, Ana Paula, Annie, Caio, Carolina Azevedo, Dr. Cristiano Reis, Dr^a. Daniela Cortez, Fellipe Dutra, Giovanna Frare, Heitor Buzetti, Nathalia Loriato, Mateus Casagrande, Matheus, Pietro Giabbani, Dr. Rafael Vieira, Dr^a. Renata Vilas Bôas, Rosemar Lima, Savienne Elerbrock, Thiago Maziero e Vinicius Ikeda.

Aos familiares e amigos que torceram e continuam torcendo pelas minhas conquistas.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP - Projeto 2017/04934-9) pela concessão da bolsa de estudo.

RESUMO

ROSA, C. M. R. **Síntese e caracterização de partículas poliméricas à base de estireno com propriedades magnéticas para utilização como matriz de imobilização de enzimas.** 2019. 130p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar partículas poliméricas à base de estireno magnetizadas por co-precipitação de íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio básico, para serem utilizadas como suporte de imobilização de enzimas. A síntese de 4 copolímeros magnéticos (STY-DVB-M, STY-EGDMA-M, STY-TEGDMA-M e STY-TMPTA-M) obtida por polimerização em suspensão empregando azobisisobutironitrila (AIBN) como iniciador foi estudada com o auxílio da metodologia estatística de arranjo ortogonal completo (L9 – Taguchi). Os fatores analisados foram: proporção monômero/ solvente; % de reticulante na massa total de monômero; proporção do solvente com alta afinidade/ solvente com baixa afinidade na mistura (toluol/heptano) e % de magnetita na massa total de monômero, sendo avaliados em 3 níveis. Como variáveis respostas foram estabelecidas: o rendimento total de polimerização e o rendimento em partículas úteis (com partículas entre 80-24 mesh). A partir da análise estatística foi possível determinar a condição de melhor ajuste para o processo de polimerização, visando o rendimento total das partículas, sendo o nível máximo para os 4 fatores estudados. Para o rendimento das partículas úteis, os ajustes indicados variaram para cada tipo de copolímero. Novos ensaios foram realizados visando confirmar os apontamentos estatísticos. A síntese dos diferentes copolímeros, empregando as melhores condições experimentais para máxima obtenção em partículas úteis, também foi realizada empregando peróxido de benzoíla como agente iniciador. Os copolímeros magnetizados obtidos foram caracterizados a partir de análises de EDX, FT-IR, Raman, ICP-OES, DRX, Histerese, DSC, TGA, Ângulo de contato, Densidade, MEV, MOC, BET e Grau de intumescimento. Por meio das análises de MEV, MOC e BET, foi possível perceber a influência dos agentes iniciadores nas características dos copolímeros, sendo observada diferenças nas morfologias e rugosidades das partículas. Já nas análises de FT-IR, DSC, TGA, Densidade, BET, Ângulo de contato e Grau de intumescimento foi possível observar a influência dos diferentes agentes reticulantes, sendo constatadas diferentes temperaturas de decomposição térmica, densidades, áreas superficiais e porcentagem de absorção do solvente heptano. A inserção da magnetita nas matrizes poliméricas foi comprovada pelas análises de EDX, ICP-OES, Histerese e Raman, apresentando saturação de magnetização entre 4 e 7 emu.g^{-1} e limite de incorporação da magnetita em torno de 35 a 40% de todo Fe_2O_3 fornecido durante a polimerização. Visando determinar a adequação das matrizes poliméricas sintetizadas para imobilização de enzimas, a lipase B de *Candida antarctica* foi imobilizada por adsorção física nos diferentes copolímeros, sendo quantificada suas atividades hidrolíticas e sintéticas. A estabilidade dos biocatalisadores que apresentaram melhor desempenho catalítico (obtidos pelos suportes de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M) foi avaliada, sendo constatadas atividades residuais superiores a 97% após incubação por 4 h a 50°C, e tempo de meia-vida de 21,6 h para a lipase imobilizada em STY-EGDMA-M, que apresentou um valor de K_d 14 vezes superior ao obtido pela sua forma livre, comprovando que o processo de imobilização forneceu maior estabilidade térmica à enzima. O trabalho experimental desenvolvido permitiu a obtenção de diferentes matrizes sólidas adequadas para utilização como suportes de imobilização de lipases, ampliando a gama desses materiais e contribuindo para a viabilidade da substituição de catalisadores químicos convencionais por biocatalisadores, empregando a tecnologia limpa.

Palavras-chave: Polimerização em suspensão. Partículas Magnéticas. Suporte polimérico à base de estireno. Biocatalisador. Imobilização de lipase.

ABSTRACT

ROSA, C. M. R. **Synthesis and characterization of styrene based particles with magnetic properties for use as an enzyme immobilization matrix.** 2019. 130p. Dissertation (Master of Science) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2019.

The aim of the present work was to synthesize and characterize styrene based particles magnetised by co-precipitation of Fe^{2+} and Fe^{3+} ions in basic media, to be used as support for enzyme immobilization. The synthesis of 4 magnetic copolymers (STY-DVB-M, STY-EGDMA-M, STY-TEGDMA-M and STY-TMPTA-M) obtained by suspension polymerization employing azobisisobutyronitrile (AIBN) as the initiator was studied with the aid of the methodology statistics of complete orthogonal arrangement (L9 - Taguchi). The factors analyzed were: monomer / solvent ratio; % crosslinker in the total monomer mass; proportion of solvent with high affinity / solvent with low affinity in the mixture (toluol / heptane) and % of magnetite in the total mass of monomer, being evaluated in 3 levels. The responses variable were established as: total polymerization yield and yield in useful particles (particles between 80-24 mesh). From the statistical analysis it was possible to determine the best fit condition for the polymerization process, aiming at the total particle yield, being the 4 factors at the maximum level. For the yield of the useful particles, the settings indicated varied for each type of copolymer. Further tests were performed to confirm the statistical notes. The synthesis of the different copolymers, employing the best experimental conditions for maximum obtainment in useful particles, was also performed employing benzoyl peroxide as the initiating agent. The obtained magnetized copolymers were characterized by EDX, FT-IR, Raman, ICP-OES, XRD, Hysteresis, DSC, TGA, contact angle, Density, SEM, OM, BET and swelling. Through the SEM, OM and BET analyzes, it was possible to observe the influence of the initiating agents on the characteristics of the copolymers, being observed differences in the morphologies and roughness of the particles. In the analysis of FT-IR, DSC, TGA, Density, BET, contact angle and degree of swelling, it was possible to observe the influence of the different crosslinking agents, noting different temperatures of thermal decomposition, densities, surface areas and percentage of heptane absorption. The insertion of magnetite into polymer matrices was confirmed by the EDX, ICP-OES, Hysteresis and Raman analyzes, with magnetization saturation between 4 and 7 emu.g^{-1} and the limit of incorporation of magnetite around 35 to 40% of all Fe_2O_3 supplied during the polymerization. In order to determine the suitability of synthesized polymer matrices for immobilization of enzymes, Lipase B from *Candida antarctica* was immobilized by physical adsorption in the different copolymers, quantifying its hydrolytic and synthetic activities. The stability of the biocatalysts that presented the best catalytic performance (obtained by the STY-EGDMA-M and STY-TEGDMA-M supports) was evaluated, with residual activity higher than 97% after incubation for 4 h at 50 ° C, and half-life equal to 21.6 h for STY-EGDMA-M immobilized lipase, which presented a K_d value 14 times higher than that obtained by its free form, proving that the immobilization process provided greater thermal stability to the enzyme. The experimental work allowed to obtain different solid matrices suitable for use as substrates for immobilization of lipases, expanding the range of these materials and contributing to the viability of replacing conventional chemical catalysts with biocatalysts using clean technology.

Keywords: Suspension polymerization. Magnetic particles. Styrene based support. Biocatalyst. Lipase immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema representativo da lipase B de <i>Candida antarctica</i> : a) modelo de fita e b) modelo de superfície.....	31
Figura 2 - Métodos de imobilização de enzimas.....	33
Figura 3 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-DVB.....	40
Figura 4 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-EGDMA.....	41
Figura 5 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-TEGDMA.....	41
Figura 6 - Esquema representativo da formação do copolímero de STY-TMPTA.....	41
Figura 7 - Estrutura cristalina da magnetita.....	47
Figura 8 - Esquema experimental empregado para a síntese dos copolímeros.....	54
Figura 9 - Etapas para a obtenção do suporte: a) Polimerização realizada em reator encamisado, b) Filtração para separação do suporte obtido, c) Lavagem das partículas poliméricas e d) Suporte polimérico magnético seco, obtido após a classificação granulométrica e sob a ação de um ímã.....	55
Figura 10 - Copolímeros magnetizados à base de estireno: (CP ₁) STY-EGDMA-M, (CP ₂) STY-TEGDMA-M, (CP ₃) STY-TMPTA-M e (CP ₄) STY-DVB-M.....	68
Figura 11 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-DVB-M.....	73
Figura 12 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-EGDMA-M.....	73
Figura 13 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-TEGDMA-M.....	74
Figura 14 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-TMPTA-M.....	74
Figura 15 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-DVB-M e representação da superfície de contorno.....	79
Figura 16 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-EGDMA-M e representação da superfície de contorno.....	80

Figura 17 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-TEGDMA-M e representação da superfície de contorno.....	80
Figura 18 - Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-TMPTA-M e representação da superfície de contorno.	80
Figura 19 - Comparação dos rendimentos em partículas úteis obtidos empregando-se AIBN e BPO como agente iniciador, para a síntese dos diferentes copolímeros.....	83
Figura 20 - Espectros obtidos pela análise de EDX dos copolímeros de STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.	85
Figura 21 - Espectro de FT-IR da magnetita pura.	86
Figura 22 - Espectros de FT-IR dos diferentes copolímeros magnetizados: STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.	86
Figura 23 - Espectros obtidos por Raman para os copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.	88
Figura 24 - Difractogramas dos copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta).	92
Figura 25 - Curva de difração de raio-X da ficha catalográfica da magnetita referenciada no <i>Joint Committee of Powder Diffraction Standards</i> (JCPDS N° 00-019-0629).....	93
Figura 26 - Curvas de Histerese obtidas para os copolímeros de STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.	94
Figura 27 - Curvas de DSC para os copolímeros de: a) STY-DVB-M, b) STY-EGDMA-M, c) STY-TEGDMA-M e d) STY-TMPTA-M, empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.....	96
Figura 28 - Curvas TGA e DTGA para os copolímeros de: a) STY-DVB-M, b) STY-EGDMA-M, c) STY-TEGDMA-M e d) STY-TMPTA-M, empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.	98
Figura 29 - Imagens da gota de água sobre as superfícies das amostras no instante zero até a completa adsorção pelo material: STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d). Copolímeros sintetizados empregando AIBN como iniciador. ...	100

Figura 30 - Micrografias dos copolímeros à base de estireno empregando AIBN como iniciador com aumento de 100 X obtidas pelo MEV: STY-DVB-M: (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d).	103
Figura 31 - Micrografias dos copolímeros à base de estireno empregando BPO como iniciador, com aumento de 100 X obtidas pelo MEV: STY-DVB-M: (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d).	104
Figura 32 - Micrografias dos copolímeros à base de estireno obtidas pelo MOC: STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), utilizando AIBN como agente iniciador.....	105
Figura 33 - Micrografias dos copolímeros à base de estireno obtidas pelo MOC: STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), utilizando BPO como agente iniciador.....	105
Figura 34 - Isotermas de adsorção e dessorção obtidas para os copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando AIBN como agente iniciador.....	106
Figura 35 - Isotermas de adsorção e dessorção para os copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando BPO como agente iniciador.	107
Figura 36 - Histereses mais frequentes em isotermas de adsorção e sua relação com o formato dos poros.....	107
Figura 37 - Grau de intumescimento dos copolímeros sintetizados empregando AIBN e BPO como iniciadores.....	109
Figura 38 - Decaimento da atividade enzimática dos biocatalisadores avaliados e ajuste linear dos dados, em função do tempo de incubação a 50°C.....	112

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - O sistema de classificação da NC-IUBMB.....	25
Tabela 2 - Aplicações industriais de enzimas: Visão Geral.....	29
Tabela 3 - Estudos empregando lipase B de <i>Candida antarctica</i>	32
Tabela 4 - Técnicas de imobilização de enzimas.....	34
Tabela 5 - Suportes utilizados para imobilização de enzimas.....	36
Tabela 6 - Estudos empregando diferentes suportes e métodos de imobilização de lipases...	37
Tabela 7 - Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.....	51
Tabela 8 - Matriz experimental (L9) empregada para a realização dos experimentos	58
Tabela 9 - Níveis dos fatores estudados na L9 e sua codificação.	58
Tabela 10 - Condições experimentais utilizadas para os testes das diferentes polimerizações.	67
Tabela 11 - Rendimentos totais obtidos para os diferentes copolímeros magnéticos sintetizados.....	68
Tabela 12 - Rendimentos de polimerização total obtidos para os copolímeros em cada ensaio do planejamento experimental dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).....	70
Tabela 13 - Análises de variância (ANOVA) para os rendimentos de polimerização total (η_{total}) obtidos para os copolímeros a partir dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).....	71
Tabela 14 - Rendimentos de polimerização das partículas úteis (η_{PU}) obtidos para os copolímeros em cada ensaio do planejamento experimental dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).	77
Tabela 15 - Análises de variância (ANOVA) para os rendimentos em partículas úteis (η_{PU}) obtidos para os copolímeros a partir dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).....	78
Tabela 16 - Confirmação da indicação do método estatístico para variável resposta rendimento total (η_{total}) e comparativo com os melhores resultados obtidos na matriz experimental inicialmente proposta (Taguchi – L9).	81
Tabela 17 - Confirmação da indicação do método estatístico para variável resposta rendimento de partículas úteis (η_{PU}) e comparativo com os melhores resultados obtidos na matriz experimental inicialmente proposta (Taguchi – L9).	82
Tabela 18 - Condições experimentais selecionadas para a obtenção dos melhores rendimentos em partículas úteis (80-24 mesh) para os diferentes copolímeros magnéticos sintetizados. ...	83

Tabela 19 - Teor de Fe obtido pela análise de ICP-OES para os copolímeros sintetizados, empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.	89
Tabela 20 - Teor de Fe obtido no copolímero de STY-DVB-M pela análise de ICP-OES, utilizando diferentes porcentagens de magnetita adicionada durante a polimerização, empregando AIBN como iniciador.....	90
Tabela 21 - Ângulos de difração (2θ) e o respectivo plano (hkl) para os picos difratados pela magnetita.	92
Tabela 22 - Tamanho dos cristalitos da magnetita inserida nos copolímeros magnéticos obtidos a partir da Equação de Scherrer.	94
Tabela 23 - Dados termogravimétricos obtidos para os diferentes copolímeros avaliados.....	97
Tabela 24 - Relação entre o ângulo de contato inicial entre a gota e a superfície da amostra e o tempo total para absorção do líquido.....	100
Tabela 25 - Densidades relativas e aparentes para os diferentes copolímeros magnéticos sintetizados com AIBN como iniciador.....	102
Tabela 26 - Resultados obtidos pela análise de BET para os copolímeros magnéticos.	108
Tabela 27 - Atividades enzimáticas dos biocatalisadores obtidas a partir da hidrólise do butirato de metila (HBM) e da esterificação do ácido oleico e etanol (EOE).....	111
Tabela 28 - Constante de desativação térmica (k_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a lipase CALB livre e imobilizada nos copolímeros de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M, sintetizados empregando AIBN como agente iniciador.	112

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1** - Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-divinilbenzeno magnetizado (STY-DVB-M)..... 114
- Quadro 2** - Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-dimetacrilato de etilenoglicol magnetizado (STY-EGDMA-M) 116
- Quadro 3** - Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-dimetacrilato de trietenoglicol magnetizado (STY-TEGDMA-M) 117
- Quadro 4** - Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-triacrilato de trimetilolpropano magnetizado (STY-TMPTA-M)..... 119

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

Água UP	Água ultrapura
AIBN	Azobisisobutironitrila
BET	Análise textural
BPO	Peróxido de benzoíla
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CFC	Cúbico de face centrada
CP_i	Copolímero
DOE	<i>Design of experiments</i> – Planejamento de experimentos
DRX	Difratometria de raio-X
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
DTGA	Derivada da análise termogravimétrica
DVB	Divinilbenzeno
EDX	Espectroscopia por energia dispersiva de raios-X
EGDMA	Dimetacrilato de etilenoglicol
EOE	Esterificação do oleato de etila
FT-IR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
FWHM	<i>Full width at half maximum</i> – Largura à meia altura
GL	Grau de liberdade dos fatores na ANOVA
HBM	Hidrólise de butirato de metila
IBGE	Instituto brasileiro de geografia e estatística
ICP-OES	Espectrometria de emissão óptica por plasma acoplado indutivamente
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
MEV	Microscopia eletrônica de varredura

MOC	Microscópio óptico comum
NC-IUBMB	Comitê de nomenclatura da união internacional de bioquímica e biologia molecular
PEG	Polietilenoglicol
PS	Poliestireno
PVA	Álcool polivinílico
SQ	Soma quadrática
SQT	Total das somas quadráticas
STY	Estireno
STY-DVB-M	Copolímero magnetizado com magnetita à base de estireno e divinilbenzeno
STY-EGDMA-M	Copolímero magnetizado com magnetita à base de estireno e dimetacrilato de etilenoglicol
STY-TEGDMA-M	Copolímero magnetizado com magnetita à base de estireno e Dimetacrilato de trietilenoglicol
STY-TMPTA-M	Copolímero magnetizado com magnetita à base de estireno e Triacrilato de trimetilolpropano
TEGDMA	Dimetacrilato de trietilenoglicol
T_{endset}	Temperatura final da curva de decomposição térmica
TGA	Análise termogravimétrica
TMPTA	Triacrilato de trimetilolpropano
T_{onset}	Temperatura inicial da curva de decomposição térmica
T_{pico}	Temperatura de pico da curva de decomposição térmica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	OBJETIVOS	23
3	REVISÃO DA LITERATURA	24
3.1	BIOCATÁLISE.....	24
3.2	ENZIMAS	24
3.3	INDÚSTRIA DE APLICAÇÃO	26
3.4	LIPASE	29
3.4.1	Lipase B de <i>Candida antarctica</i> (CALB)	31
3.5	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	32
3.6	SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS	35
3.7	SUPORTES POLIMÉRICOS	39
3.8	POLÍMEROS	42
3.8.1	Polimerização em Massa	43
3.8.2	Polimerização em Solução	44
3.8.3	Polimerização em Emulsão	44
3.8.4	Polimerização em Suspensão	45
3.9	COMPOSTOS MAGNÉTICOS.....	46
3.10	PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS.....	48
3.10.1	Taguchi.....	48
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1	MATERIAIS	50
4.1.1	Síntese dos suportes.....	50
4.1.2	Magnetização dos copolímeros	50
4.1.3	Imobilização e determinação da atividade enzimática	50
4.2	EQUIPAMENTOS.....	51
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL.....	52
4.3.1	Purificação dos iniciadores das reações de polimerização: AIBN (azobisisobutironitrila) e BPO (peróxido de benzoíla).....	52
4.3.2	Síntese da Magnetita: Co-Precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3}	52
4.3.3	Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico	53
4.3.4	Síntese dos copolímeros magnéticos à base de estireno.....	53
4.3.5	Imobilização da lipase CALB nas matrizes poliméricas sintetizadas	55

4.3.6	Determinação da atividade enzimática dos biocatalisadores	56
4.3.7	Estabilidade térmica dos biocatalisadores	57
4.4	PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL	57
4.4.1	Arranjo ortogonal – Taguchi L9	57
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS MAGNÉTICOS.....	59
4.5.1	Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)	60
4.5.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)	60
4.5.3	Espectroscopia Raman	60
4.5.4	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES).....	61
4.5.5	Difratometria de Raios-X (DRX)	61
4.5.6	Determinação da curva de magnetização (Histerese)	62
4.5.7	Calorimetria diferencial de varredura (DSC).....	62
4.5.8	Análise termogravimétrica (TGA).....	63
4.5.9	Ângulo de contato	63
4.5.10	Densidade.....	63
4.5.11	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	64
4.5.12	Microscópio Óptico Comum (MOC).....	64
4.5.13	Análise Textural pelo Método de BET por múltiplos pontos (Braunauer, Emmet e Teller)	65
4.5.14	Determinação do Grau de Intumescimento (GI %)	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
5.1	EMPREGO DA METODOLOGIA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE ARRANJO ORTOGONAL COMPLETO (L9 -TAGUCHI)	69
5.1.1	Influência dos fatores A, B, C e D no rendimento total de polimerização dos copolímeros magnetizados.....	69
5.1.2	Influência dos fatores A, B, C e D no rendimento das partículas úteis (80-24 mesh) dos copolímeros magnetizados	76
5.1.3	Experimentos de confirmação das indicações das melhores condições de síntese dos copolímeros, de acordo com a metodologia experimental (Taguchi – L9)	81
5.1.4	Influência do tipo de agente iniciador no rendimento das partículas úteis dos copolímeros magnéticos	83
5.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS MAGNETIZADOS SINTETIZADOS	84
5.2.1	Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)	84
5.2.2	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR).....	86
5.2.3	Espectroscopia Raman	88

5.2.4	Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)	89
5.2.5	Difratometria de Raios-X (DRX)	91
5.2.6	Determinação da curva de magnetização (Histerese)	94
5.2.7	Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	95
5.2.8	Análise Termogravimétrica (TGA)	97
5.2.9	Ângulo de contato	99
5.2.10	Densidade	101
5.2.11	Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	102
5.2.12	Microscopia óptica comum (MOC)	104
5.2.13	Análise Textural pelo Método de BET (Braunauer, Emmet e Teller)	106
5.2.14	Grau de Intumescimento	109
5.3	CARACTERÍSTICAS DOS BIOCATALISADORES SINTETIZADOS	110
5.3.1	Atividade enzimática dos biocatalisadores sintetizados.....	110
5.3.2	Estabilidade térmica dos biocatalisadores selecionados	112
5.4.	COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES SUPORTES SINTETIZADOS	113
6	CONCLUSÕES	120
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	122
	REFERÊNCIAS	123

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, partículas magnéticas compostas por óxidos de ferro, têm atraído muito interesse devido às suas propriedades multifuncionais, tais como, biocompatibilidade, superparamagnetismo, tamanho reduzido e baixa toxicidade (REN et al., 2011). São utilizadas em diferentes aplicações nas áreas biomédicas, físicas e biotecnológicas, destacando-se: a imobilização de proteínas, enzimas e drogas; diagnósticos por imagem; imunoenaios; separação magnética de células e sua purificação e liberação controlada de fármacos (BENTO et al., 2017; GERVALD; GRITSKOVA; PROKOPOV, 2010).

Especialmente no campo da biocatálise, as partículas magnéticas destacam-se por apresentarem diversas vantagens de operação, como: elevada área superficial, possibilitando maior disponibilidade para imobilizar enzimas; baixa resistência à transferência de massa, fazendo com que as enzimas imobilizadas sejam mais estáveis e facilidade de separação das partículas magnéticas, devido a possibilidade da utilização de um ímã externo, permitindo a preservação da enzima imobilizada em comparação aos métodos tradicionais de centrifugação e filtração (CAMILO, 2006; JOSÉ; SANCHEZ DE ALMEIDA PRADO, 2005; POLSHETTIWAR et al., 2011).

Partículas de poli (estireno-co-divinilbenzeno) magnetizadas com íons de ferro vêm sendo testadas com sucesso para imobilização de lipases, como demonstrado em trabalhos anteriores (BENTO, 2015; BENTO et al., 2017; SILVA et al., 2017), indicando um potencial promissor da utilização deste material para a obtenção de biocatalisadores ativos.

O poliestireno é um polímero aromático, disponível comercialmente e pode apresentar características tanto do tipo gel, não possuindo poros permanentes, como também do tipo macroporosa, com poros permanentes. Esta última é a adequada para utilização como suporte de insolubilização de lipases, visto que apresenta elevada área específica e alto grau de hidrofobicidade, facilitando a imobilização e permitindo maior carregamento enzimático, em comparação aos outros suportes utilizados para esta finalidade (BASSI et al., 2016). O processo de imobilização consiste em confinar fisicamente enzimas retendo sua atividade catalítica, possibilitando sua utilização de forma repetida, elevando sua estabilidade térmica, além de facilitar a separação do meio reacional (ZANIN; MORAES, 2014).

No presente trabalho o poliestireno foi associado à diferentes agentes reticulantes, produzindo copolímeros magnetizados por meio da inserção de íons de Fe^{2+} e Fe^{3+} por coprecipitação, formando microesferas poliméricas magnetizadas. Dessa forma, visou-se

produzir diferentes suportes com propriedades adequadas para a imobilização de lipases, visto que polímeros reticulados de formas distintas, apresentam características específicas devido à possibilidade de alteração nas propriedades do material sintetizado. Ressalta-se que dados referentes à copolímeros magnéticos que empregam agentes reticulantes diferentes do divinilbenzeno são escassos na literatura, o que torna o presente trabalho relevante, dando continuidade aos estudos nesta linha de pesquisa (BENTO et al., 2017; SILVA, 2017; SILVA et al., 2017).

Com o intuito de otimizar o rendimento de polimerização, foi empregada uma ferramenta estatística conhecida por DOE (*design of experiments*), bastante aplicada aos sistemas de engenharia, que utiliza métodos estatísticos para compor matrizes experimentais, e assim planejar de maneira eficiente a varredura do processo. Dentre as várias metodologias estatísticas para se estudar um processo, destaca-se o Taguchi, que baseia-se no uso de matrizes ortogonais. A metodologia de Taguchi permite quantificar efeitos lineares e combinações de variáveis adequadas para a melhoria do sistema, encontrando configurações ótimas dos fatores de controle, tornando um produto ou processo insensível aos fatores de ruído (MÄKELÄ, 2017; XIANSHENG et al., 2011).

Nesse contexto, o trabalho visou promover um avanço na busca por novos materiais que possam ser utilizados como matrizes de insolubilização de enzimas, possibilitando o desenvolvimento de novos biocatalisadores para diferentes setores industriais, contribuindo assim, para a substituição dos catalisadores químicos convencionais por “catalisadores ecologicamente corretos”.

2 OBJETIVOS

O objetivo principal do projeto foi sintetizar matrizes poliméricas híbridas à base de estireno magnetizada por partículas de magnetita (Fe_3O_4), avaliando a influência de alguns fatores na polimerização em suspensão, visando a obtenção de suportes que apresentem características adequadas para a imobilização de lipases. Para esta finalidade foram executados os seguintes objetivos específicos:

- Estabelecimento das melhores condições de síntese de copolímeros à base de estireno e diferentes agentes reticulantes, verificando a influência de alguns fatores na polimerização em suspensão com o auxílio da ferramenta estatística da Metodologia Taguchi.
- Caracterização dos copolímeros magnetizados quanto suas características morfológicas, térmicas e magnéticas.
- Avaliação da adequação das matrizes poliméricas como suportes para imobilização de lipase microbiana, a partir da quantificação da atividade catalítica dos biocatalisadores obtidos, bem como sua estabilidade térmica.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BIOCATÁLISE

A biocatálise é o termo geral utilizado para a transformação de compostos naturais e sintéticos por enzimas. Nos últimos anos, a biocatálise vem fornecendo tecnologias sustentáveis e enzimas seletivas, possibilitando a transição de processos químicos convencionais para processos ambientalmente amigáveis (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

Esse campo vem ganhando grande atenção, visto que faz parte da chamada “química verde”, muito atrativa por diversos setores industriais, devido ao apelo por processos mais limpos e que proporcionem efluentes e resíduos menos tóxicos. Esse quadro atual justifica o crescente aumento de publicações científicas e de processos biocatalíticos. Vinculado à esse avanço tecnológico, novas técnicas possibilitarão à aplicação de biocatalisadores em diferentes processos industriais, uma vez que é sabido que sistemas enzimáticos produzem transformações estruturais mais seletivas (e/ou mais complexas) e em condições mais brandas (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001; LUCCHESI et al., 2012).

3.2 ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos, que aceleram as velocidades de reações químicas que ocorrem dentro de células vivas, sem que sofram qualquer alteração. Todas as enzimas são proteínas, no entanto, sem a presença de um componente chamado cofator (não protéico), muitas dessas proteínas enzimáticas não apresentam atividade catalítica. O cofator pode ser uma molécula orgânica, conhecido como coenzima, ou pode ser um íon metálico. Os reagentes das reações catalisadas por enzimas são denominados substratos. Cada enzima tem um caráter bastante específico, atuando em um determinado substrato (s) para produzir um determinado produto (s) (PALMER; BONNER, 2011a).

As enzimas possuem a capacidade de aceitar como substrato uma grande variedade de moléculas, tanto naturais quanto sintéticas. A aplicação de enzimas como catalisadores biológicos é impulsionada pela sua versatilidade, regio-, quimio- e enantioseletividade, junto à necessidade da indústria química em transformar seus processos e catalisadores mais

limpos. Avanços científicos em biocatálise foram alavancados pela necessidade da indústria farmacêutica e do setor de química fina, que utilizam processos geralmente caracterizados por baixa eficiência e alta produção de resíduos (BOMMARIUS; RIEBEL-BOMMARIUS, 2005; LI et al., 2012; PELLIS et al., 2018; SHELDON, 2007).

O Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular (NC-IUBMB) agrupou as enzimas em seis classes principais. Cada enzima recebeu um código de números, composto por quatro números, separados por pontos. O primeiro dígito mostra a classe que a enzima pertence, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: O sistema de classificação da NC-IUBMB.

Primeiro dígito	Classe de Enzimas	Tipo de reação catalisada
1	Oxirredutases	Reação de Oxidação / Redução
2	Transferases	Transferência de um átomo ou grupo entre duas moléculas (excluindo reações em outras classes)
3	Hidrolases	Reações de hidrólise
4	Liasas	Remoção de um grupo do substrato (não por hidrólise)
5	Isomerasas	Reações de isomerização
6	Ligases	A união sintética de duas moléculas

Fonte: (PALMER; BONNER, 2011a).

O segundo dígito descreve uma subclasse dentro da classe primária e o terceiro dígito do código, descreve o grupo químico específico participante da reação. As enzimas que catalisam reações muito semelhantes, mas não idênticas, por exemplo, a hidrólise de diferentes ésteres de ácido carboxílico, terão os mesmos três primeiros dígitos em seu código. O quarto dígito distingue qual enzima, propriamente dita catalisa a reação, definindo o substrato real, ou seja, qual éster de ácido carboxílico realmente será hidrolisado (PALMER; BONNER, 2011a).

3.3 INDÚSTRIA DE APLICAÇÃO

O Brasil é um dos líderes mundiais em consumo de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, sendo o quarto maior consumidor desses produtos, seguindo Estados Unidos, China e Japão (BASILIO, 2017b, 2017a). De acordo com o censo realizado pelo IBGE em 2016, a população idosa no Brasil representa aproximadamente 15% da população total, ou seja, cerca de 30 milhões de pessoas com idade igual ou superior a 60 anos. Essa parcela corresponde à 20% de todo o mercado consumidor de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos. Visando então, atender esse público crescente, a indústria cosmética busca melhorar seus processos, de forma que a produção além de elevada empregue processos mais limpos (IBGE, 2017). A indústria cosmética é segmentada em: cuidados com a pele, cuidados com cabelos, maquiagem, fragrâncias e produtos de higiene.

Ésteres, que podem ser sintetizados pela rota enzimática empregando lipases como biocatalisadores, são muito utilizados na indústria cosmética em: emolientes em cremes, surfactantes em shampoos, antioxidantes em loções antienvhecimento, fragrâncias em perfumes e sabores em batons. Os ésteres emolientes, formados por cadeias longas, são componentes de cosméticos com características hidratantes, que ajudam a manter a suavidade e a plasticidade da pele, reduzem a sensação de coceira na pele seca e melhoram a aparência do estrato córneo. Representam uma classe muito importante desse setor, devido sua não toxicidade, biodegradabilidade e boa solubilidade em gordura (CHAO et al., 2018; TERESCENCO et al., 2018).

Assim como na indústria cosmética outras áreas industriais também se beneficiam de processos mais limpos pela utilização de biocatalisadores, como por exemplo a indústria farmacêutica e de agrotóxicos, que já empregam uma variada gama de enzimas em alguns processos, na busca por novas drogas e agentes agrotóxicos. Por exemplo, a síntese do fármaco (1R, 2S)-efedrina, que apresenta atividade β -adrenérgico, a partir da catálise da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e dos antibióticos ampicilina, amoxicilina, cefalexina e cefadroxil, fazendo uso da enzima *Penicilina acilase*. Como exemplo da síntese enzimática para agrotóxicos, tem-se a produção do agrotóxico fusilade, que utiliza a enzima D-CPA desalogenase (CONTI; RODRIGUES; MORAN, 2001).

Na indústria têxtil as enzimas são utilizadas tanto para o melhoramento dos processos de produção como também para o acabamento final do tecido. A enzima amilase é muito utilizada em processos de degomagem, que visa eliminar a goma dos fios de algodão, já que

estes são geralmente revestidos em amido (engomados) para impedir o rompimento do fio durante a tecelagem. Após a formação do tecido essa goma deve ser removida. Para evitar os danos causados pela desengomagem convencional que utiliza ácidos ou agentes oxidantes como persulfatos (de sódio, amônio ou potássio) ou peróxido de hidrogênio, em meio fortemente alcalino sob elevadas temperaturas, causando a redução da resistência dos tecidos devido a degradação da fibra, é empregada a degomagem enzimática (BLAMEY et al., 2016; PATEL, 2014).

As celulasas também são bastante utilizadas na indústria têxtil, a fim de evitar a descamação e melhorar a suavidade e o brilho da cor dos tecidos. Esse processo é conhecido como biopolimento, que é a remoção enzimática de fibrilas e de pilosidade dos tecidos ou malhas de algodão. As celulasas são capazes de tornar os tecidos mais lisos e macios, degradando as fibras da superfície, que são basicamente compostas por celulose. Também são usadas no processo de desbotamento de tecidos de algodão, gerando a aparência “*stonewashed*” nos jeans. Tradicionalmente esse resultado é obtido por um processo que utiliza pedra-pomes para desbotar a cor no local (por atrito). No entanto, esse processo apresenta como desvantagem o desgaste rápido da peça, devido aos fragmentos das pedras, provocando excessiva abrasão, piorando a qualidade do artigo. O emprego do processo enzimático utilizando celulase, resulta em um melhor toque (pois não causa grande degradação da fibra como com a pedra-pomes) e aspecto de desbotado mais uniforme (DOBLE; KRUTHIVENTI, 2006; PATEL, 2014).

As catalases também podem ser usadas para degradar o peróxido de hidrogênio residual após o branqueamento do algodão. A remoção do peróxido se faz necessária para que as fibras possam ser tingidas. As proteases são usadas no tratamento da lã e na desengomagem da seda cru. Quando empregadas juntas, as pectinases, proteases e lipases (biopreparação), são utilizadas para a remoção de impurezas não celulósicas, visando o desprendimento de pigmentos naturais das fibras (DUPONT, 2014; PATEL, 2014; PHILLIPS, 2017).

A indústria de alimentos e bebidas é um dos maiores empregadores de enzimas em sua produção. Na indústria de panificação, várias enzimas são utilizadas com o intuito de melhorar a produção ou a conservação dos alimentos, como as amilases (glicohidrolases), que atuam no volume dos pães, na textura do miolo, na cor da casca e no sabor, além de aumentar a vida de prateleira do produto. As invertases permitem menor adição de açúcar na formulação do pão (CARMIGNOLA, 2017).

Na produção do leite pasteurizado, a atividade de algumas enzimas pode ser determinada antes e depois dos procedimentos de pasteurização e esterilização, visando verificar se estas etapas foram corretamente realizadas. Por exemplo, a fosfatase alcalina presente no leite, é inativada na temperatura ideal para a pasteurização, de modo que, a presença ou ausência da atividade dessa enzima ao final do processo, dará uma indicação de sua eficácia (PALMER; BONNER, 2011b).

Na fabricação de cerveja e vinho, por exemplo, a alfa-acetolactato descarboxilase é adicionada para reduzir o tempo de maturação, assegurando uma produção consistente e de alta qualidade. Várias enzimas participam da fermentação para a produção de vinhos, um exemplo é a invertase, que degrada a molécula de sacarose, que é um dissacarídeo que precisa ser convertido em glicose e frutose (monossacarídeos utilizados na fermentação). As proteases facilitam a ação das leveduras e bactérias lácteas, atuando na degradação das proteínas do mosto em polipeptídeos e aminoácidos, facilmente assimilados pelos microrganismos responsáveis pelas fermentações alcoólica e malolática (BLAMEY et al., 2016; SANTOS et al., 2016).

A indústria de papel e celulose é outro ramo que vem aumentando o uso de enzimas em sua produção. Lipases são utilizadas na remoção do *pitch* da celulose produzida na indústria de papel. '*Pitch*' é um termo usado para descrever coletivamente os componentes hidrofóbicos da madeira, ou seja, os triglicerídeos e as ceras, que causam graves problemas na fabricação do papel. A *Nippon Paper Industries* no Japão desenvolveu um método de controle de *pitch* que usa uma lipase fúngica (*Candida rugosa*) para hidrolisar os triglicerídeos (≈90 %). As xilanases podem ser empregadas nos processos de branqueamento, reduzindo o consumo de compostos químicos (BLAMEY et al., 2016; DOBLE; KRUTHIVENTI, 2006; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; REETZ, 1998).

Na indústria de detergentes, as enzimas representam uma importante participação, sendo adicionadas às formulações. Todos os detergentes contêm ingredientes similares e são baseados em mecanismos de detergência semelhantes. Visando melhorar esse poder de detergência, algumas formulações, como detergentes em pó para limpeza pesada e detergentes para máquina de lavar louças, empregam enzimas, como proteases, amilases, celulasas e lipases, proporcionando algumas vantagens, como a redução no consumo de água e energia, em decorrência de uma maior eficiência na lavagem em temperaturas mais amenas, além da biodegradabilidade (CHIES, 2014; DOBLE; KRUTHIVENTI, 2006; DUPONT, 2014; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; PHILLIPS, 2017).

Outra aplicação de interesse seria a produção do biodiesel, biocombustível em potencial para substituição do diesel de origem fóssil. O biodiesel pode ser produzido pela via química ou pela via enzimática, sendo que a síntese via transesterificação enzimática, utilizando lipases, gera um produto mais puro, permite fácil separação do subproduto glicerol e não gera efluentes tóxicos. A maior vantagem do biodiesel em comparação com outros combustíveis alternativos é que ele pode ser usado em motores à diesel sem qualquer modificação, podendo ser misturado em qualquer diesel de petróleo refinado (ADLERCREUTZ, 2013; BLAMEY et al., 2016; HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; NARWAL; GUPTA, 2013; PATEL, 2014; SAIBI et al., 2012). A Tabela 2 apresenta um resumo das aplicações de enzimas em diversos setores industriais.

Tabela 2: Aplicações industriais de enzimas: Visão Geral

Enzima	Setor produtivo	Aplicação
Protease	Alimentício	Fabricação de alimentos para bebês e para proteínas pré-digeridas
Lipase	Higiene/Cosmético	Produção de detergentes e cremes para pele
	Energético	Produção de biocombustíveis
Carboidrase	Alimentício	Conversão de xarope de amido em xarope de açúcar (fabricação de bebidas esportivas)
Isomerase	Alimentício	Fabricação de produtos emagrecedores / perda de peso - conversão do xarope de glicose (amido de milho) em isoglicose (frutose)
Xilanases	Celulose e Papel	Processo de branqueamento das fibras
Amilase	Alimentício	Fabricação de pão, aumentando a vida de prateleira

Fonte: Adaptado de BLAMEY et al., 2016.

3.4 LIPASE

As lipases (triacilglicerol éster hidrolases, EC 3.1.1.3) podem ser originadas de três fontes: microbiana, vegetal e animal, sendo as de origem microbiana as de maior interesse industrial e biotecnológico, visto que, apresentam uma série de vantagens quando comparadas

às de origem animal ou vegetal. Dentre os diferentes tipos de lipases, as mais utilizadas para sínteses orgânicas são: as lipases de *Candida rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Candida antarctica*, *Burkholderia cepacia*, *Aspergillus niger*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* (AL-ZUHAIR, 2012; BENTO, 2015; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; NARWAL; GUPTA, 2013).

Essas enzimas são capazes de catalisar a hidrólise de ligações éster-carboxílico na interface óleo/água, obtendo como produtos ácidos e álcoois orgânicos (BENTO, 2015; COLLA; REINEHR; COSTA, 2012; FORESTI et al., 2010). Em meios reacionais aquo-restritos, as lipases podem catalisar diferentes reações, como esterificação, transesterificação (interesterificação, alcoólise e acidólises) e aminólise. Além de serem versáteis quanto à atuação, as lipases são quimio-, regio- e enantiosseletivas, características que inibem a formação de subprodutos, melhorando o rendimento dos processos (ADLERCREUTZ, 2013; DE CASTRO et al., 2004; VILLENEUVE et al., 2000).

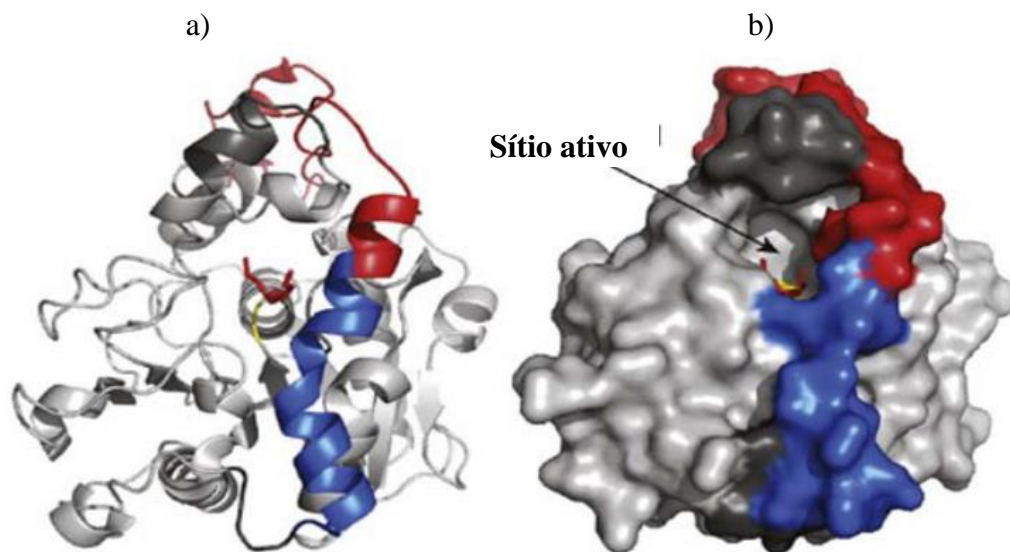
As lipases podem apresentar-se de duas formas distintas: ativa (aberta) e inativa (fechada). Em seu estado inativo, o sítio ativo é inacessível ao substrato, sendo coberto pela “lid” (uma espécie de tampa formada por uma cadeia peptídica). A conformação fechada pode se converter na forma aberta pela interação da lipase com a interface lipídio/água, promovendo o acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, na qual contém a tríade catalítica (formada por serina, histidina e ácido aspártico ou glutâmico), o que possibilita a catálise enzimática. Esse mecanismo é conhecido como o Fenômeno da Ativação Interfacial, e embora a atividade catalítica seja nitidamente aumentada na presença dessa interface para muitas lipases, esse fenômeno não é evidenciado para todas as lipases (CARVALHO, 2015; WONG; SCHOTZ, 2002).

Embora sejam versáteis, a utilização industrial das lipases ainda é restrita, visto que, são instáveis à temperaturas elevadas e à solventes orgânicos, perdendo sua atividade catalítica com certa facilidade, além de não poderem ser reutilizadas em operações contínuas. Dessa forma, uma alternativa para a viabilização da sua utilização industrial seria a imobilização, técnica que oferece uma série de vantagens, como a permanência da atividade catalítica por um período prolongado de tempo; possibilidade de operação contínua do processo; facilidade de separação do produto final e da interrupção da reação; maior estabilidade térmica e ao pH e redução da inibição tanto por substrato como pelo produto (ADLERCREUTZ, 2013; DE CASTRO et al., 2004).

3.4.1 Lipase B de *Candida antarctica* (CALB)

Existem dois tipos principais de lipases de *Candida antarctica*, provenientes de leveduras do gênero *Candida*, tipo A (CALA) e tipo B (CALB), sendo a CALB a mais empregada em reações de síntese. Na Figura 1 está ilustrada a estrutura da lipase B de *Candida antarctica*, que não possui “lid”, o que poderia limitar o acesso do substrato ao sítio ativo, não necessitando de um mecanismo de ativação interfacial (LIMA et al., 2019).

Figura 1: Esquema representativo da lipase B de *Candida antarctica*: a) modelo de fita e b) modelo de superfície.



Fonte: Adaptado de CASAS; RAMOS; PÉREZ, 2013.

A lipase B de *Candida antarctica* é uma lipase que apresenta alta enantiosseletividade e estereosseletividade, elevada estabilidade térmica e é muito resistente à solventes orgânicos (TANASKOVIĆ et al., 2017). Essa lipase é bastante conhecida comercialmente na sua forma imobilizada, a Novozym 435[®] (Novozymes). O suporte utilizado é uma resina polimérica acrílica (Lewatit 84 VP OC 1600), considerado moderadamente hidrofóbico. Essa característica, dependendo da aplicação, pode não ser adequada, como por exemplo na síntese do biodiesel, em que é gerado glicerol que pode ser retido na matriz polimérica, prejudicando a eficácia da catálise (CUNHA et al., 2014; FORESTI et al., 2010). Destaca-se também o elevado custo deste biocatalisador comercial.

Nesse sentido, vários estudos vêm sendo desenvolvidos visando obter alternativas de suportes para imobilização dessas enzimas, como o presente trabalho que estudou a

viabilidade de diferentes matrizes poliméricas. A Tabela 3 apresenta uma visão geral dos trabalhos que estão sendo desenvolvidos empregando a lipase B de *Candida antarctica* imobilizada em diferentes suportes.

Tabela 3: Estudos empregando lipase B de *Candida antarctica*.

Suporte	Aplicação	Referência
PS-co-DVB magnetizado	Síntese de miristato de isopropila	(SILVA et al., 2018a)
Partículas à base de estireno, metacrilato de metila, benzoato de vinila ou cardanol	Esterificação de oleato de etila e hidrólise de laureato de <i>p</i> -nitrofenil	(CUNHA et al., 2014)
Quitosana	Obtenção de biodiesel por transesterificação do óleo de mamona	(CRUZ JR, 2007)
Sílica funcionalizada com epóxi	Produção enzimática de biodiesel a partir de óleo de canola	(BABAKI et al., 2015)
PS-co-DVB	Estudo da biotransformação de ligação C-C não convencional	(IZQUIERDO et al., 2014)
PS-co-DVB	Produção e otimização do palmitato de isopropilo via rota biocatalítica	(BARSÉ et al., 2019)
PS / PMMA	Hidrólise de laureato de <i>p</i> -fenil	(BESTETI et al., 2014)

Fonte: Próprio autor

3.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Diferentes métodos para a modificação de enzimas vêm sendo estudados com o intuito de introduzir aminoácidos em suas superfícies, que favoreçam as interações com os suportes sólidos ou que alterem o seu ponto isoelétrico. No entanto, tais modificações devem ser aplicadas cuidadosamente, visto que, uma alteração na estrutura do sítio ativo da enzima, pode interferir na sua atividade e estabilidade (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VILLENEUVE et al., 2000).

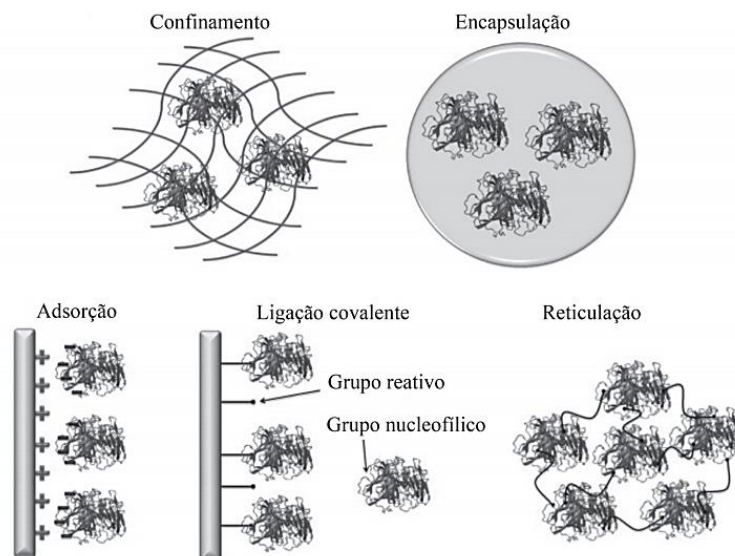
O principal método de modificação de enzimas é a sua imobilização, na qual é possível alterar parâmetros naturais da enzima. A técnica de imobilização visa à redução do custo global de um processo enzimático, proporcionando algumas vantagens às enzimas livres, como maior estabilidade térmica e resistência às variações de pH, facilidade de separação do meio reacional, além de possibilitarem uma operação contínua, facilitando um maior controle das variáveis do processo, visto que o biocatalisador é retido no interior do biorreator (FORESTI et al., 2010; ZHANG et al., 2012).

A seleção de uma estratégia de imobilização é baseada em alguns parâmetros como, custo do procedimento de imobilização, toxicidade dos reagentes envolvidos no processo, eficácia da recuperação da atividade enzimática, bem como as propriedades finais desejadas da enzima imobilizada (VILLENEUVE et al., 2000).

A imobilização, ou seja, o aprisionamento de enzimas ou células em uma matriz adequada, é uma prática importante na enzimologia e fundamental para viabilizar economicamente a utilização das enzimas. A atividade das enzimas imobilizadas depende da área superficial, da porosidade e do caráter hidrofóbico/hidrofílico do veículo selecionado, além da técnica escolhida para a imobilização e das condições de reação (BAHULEKAR; AYYANGAR; PONRATHNAM, 1991).

A Figura 2 apresenta alguns métodos de imobilização, podendo ser divididos em métodos que envolvem a interação da enzima com uma matriz (geralmente através de uma ligação química) e aqueles em que a enzima está contida dentro de um espaço restrito.

Figura 2: Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: (SOUZA et al., 2017).

Na imobilização por confinamento ou encapsulação, as enzimas são aprisionadas no interior de microcápsulas ou membranas semipermeáveis, sem qualquer tipo de ligação entre a enzima e o suporte. Neste método, as moléculas menos complexas, como substrato e produtos, se difundem no meio reacional e entram em contato com o sítio catalítico das enzimas, ao mesmo tempo que moléculas mais complexas, como as proteínas (enzimas), que não são hábeis em se difundirem pela parede, ficam retidas no interior do suporte (ILLANES, 2011; SOUZA et al., 2017).

No método de imobilização via ligação química, as proteínas se ligam à superfície do suporte, seja por adsorção iônica ou por ligação covalente entre os resíduos de aminoácidos constituintes da enzima e grupos ativos na superfície do suporte (ILLANES, 2011; QUILLES JR, 2017; SOUZA et al., 2017).

A Tabela 4 descreve os possíveis métodos de imobilização de enzimas.

Tabela 4: Técnicas de imobilização de enzimas.

Método	Vantagens	Desvantagens
Adsorção	Simplicidade, pouca ou nenhuma mudança na conformação da enzima	Ligação fraca podendo levar à dessorção da enzima
Ligação Covalente	Ligação estável entre enzima e suporte	Preparação difícil, de alto custo e impossível regeneração do suporte
Ligação Cruzada	Enzimas fortemente ligadas	Perda de atividade durante a preparação, impossível regeneração do suporte e custo elevado
Aprisionamento e Encapsulação	Enzima não interage quimicamente com o suporte	Limitações de transferência de massa

Fonte: Adaptado de DALLA-VECCHIA, NASCIMENTO, SOLDI, 2004 e VILLENEUVE et al., 2000.

Dentre os métodos citados na Tabela 4, a imobilização por adsorção física é o método mais utilizado, pela facilidade de execução, baixo custo, pela não necessidade de ativação do suporte, além de possibilitar a regeneração da matriz utilizada. As interações envolvidas são geralmente de baixa energia, como forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas, o que permite uma retenção máxima da atividade enzimática, visto que não afetam a estrutura

natural da enzima, conservando seu sítio ativo (ADLERCREUTZ, 2013; BENTO, 2015; PEREIRA, 2014; VILLENEUVE et al., 2000).

Em geral, como a adsorção das enzimas nos suportes ocorre na superfície, alguns parâmetros como tamanho da enzima, área superficial e porosidade do adsorvente, possuem forte influência sobre eficiência do método de imobilização. Além disso, a afinidade enzima-suporte é uma característica muito importante, que pode ser assegurada pela presença de grupos ativos específicos na matriz do suporte, que permitem a geração das interações enzima-suporte. Contudo, na ausência desses grupos, as interações podem ser ajustadas por meio da utilização de agentes intermediários (ADLERCREUTZ, 2013; BENTO, 2015; PEREIRA, 2014; VILLENEUVE et al., 2000).

A imobilização por adsorção física, apresenta como desvantagem, a dessorção da enzima, em decorrência das variações de temperatura, pH e força iônica (BENTO, 2015; DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; PEREIRA, 2014), entretanto, em meio orgânico essas desvantagens são reduzidas tornando esse procedimento recomendável para imobilização de lipases.

Ressalta-se que este método de imobilização foi adotado para imobilizar a lipase selecionada visando avaliar os diferentes copolímeros magnéticos desenvolvidos no presente trabalho.

3.6 SUPORTES PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Ainda que processos enzimáticos apresentem vantagens, a aplicação industrial das enzimas é prejudicada pela insatisfatória estabilidade operacional e de armazenamento, alta sensibilidade às condições ambientais e dificuldades de recuperação e reutilização. Visando melhorar o desempenho dos processos industriais, as enzimas devem ser imobilizadas em suportes sólidos adequados. Tais suportes evitam a agregação das moléculas enzimáticas e estabilizam suas formas ativas, visto que a fixação da enzima sobre o suporte sólido geralmente eleva sua estabilidade operacional, térmica e ao pH. Quando imobilizadas, as enzimas podem ser facilmente separadas do meio reacional e recicladas para uso repetido (PRLAINOVIĆ et al., 2016; ROYVARAN et al., 2016).

A eficiência da imobilização é regida pelas propriedades da enzima e do material do suporte. O suporte deve ser selecionado em função da máxima retenção da atividade catalítica

que o conjunto suporte-método apresentar, ou seja, quanto mais elevado, mais adequado será o conjunto. Essa adequação dependerá das características peculiares do material biológico (enzima) e das condições de uso do sistema imobilizado (suporte/enzima). Para tanto, não existe um suporte universal, sendo necessário um estudo para determinação de qual o melhor suporte, tendo em vista que para cada aplicação é necessário selecionar um procedimento de fácil execução e de baixo custo, objetivando a obtenção de uma enzima imobilizada com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (DALLA-VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; PEREIRA, 2014; VILLENEUVE et al., 2000).

O suporte pode ser um polímero sintético, um polímero natural ou um sólido inorgânico, como apresentado na Tabela 5.

Tabela 5: Suportes utilizados para imobilização de enzimas.

Orgânicos		Inorgânicos	
Polímeros Naturais	Polímeros sintéticos	Minerais Naturais	Materiais processados
Quitosana, alginato, colágeno, celulose, agar-agar, quitina, amido, albumina	Poliestireno, poliacrilatos, poliamidas, polipropileno, resinas epoxy	Sílica, bentonita, terra diatomácea, areia	Vidro, metais, óxidos metálicos, cerâmicas, alumino silicatos

Fonte: Adaptado de FUENTES et al., 2006; JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014; MOHAMAD et al., 2015; WILSON et al., 2006.

A interação enzima/suporte fornece uma enzima imobilizada com propriedades químicas, bioquímicas, mecânicas e cinéticas específicas. No intuito de buscar a melhor combinação entre esses dois fatores, algumas estratégias são utilizadas, como por exemplo a modificação do material sólido, alterando o tamanho de poros pela introdução de aditivos e/ou estabilizantes durante a síntese do suporte, de forma a melhorar a relação custo-benefício do processo (CANTONE et al., 2013; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014).

Vários grupos de pesquisa estudam os diferentes métodos de imobilização visando encontrar o melhor par enzima/ suporte, como mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Estudos empregando diferentes suportes e métodos de imobilização de lipases.

Suporte	Método de imobilização	Enzima	Resultado	Referência
STY-co-DVB magnetizado	Adsorção física	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i>	Os biocatalisadores foram empregados na síntese de ésteres etílicos, constatando-se que a lipase de <i>B. cepacia</i> imobilizada não apresentou perda de atividade durante 7 ciclos, revelando um tempo de meia-vida de 970 h.	(SILVA et al., 2018b)
Nanopartícula de PHBV	Adsorção física	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Verificou-se que 2h de contato entre enzima/suporte promoveu maior atividade, quando comparada à 1h de contato	(FERNANDES et al., 2014)
Octil-agarase, Hexil-toyoppearl e Octadecil-sepabeads	Adsorção física	<i>Candida antarctica</i> e <i>Thermomyces lanuginosus</i> (LTL)	Os melhores resultados foram obtidos em octil-agarose: aumento de 45 vezes na atividade da LTL e 196 vezes na estabilidade térmica da CALB	(MENDES, 2009)
Partículas de PHB, bagaço de cana, quitosana/alginate	Ligação covalente	<i>Candida antarctica</i> (CALB)	Melhor atividade e tempo de meia vida obtidos em suporte de quitosana-alginate modificado com TNBS	(MENDES; DE CASTRO; DE L.C. GIORDANO, 2013)
Filme de quitosana ativado com glutaraldeído	Ligação covalente	<i>Candida cylindracea</i>	Observou-se perda de atividade no segundo ciclo de uso e estabilidade até o quarto ciclo	(AMORIM et al., 2003)
Celite	Adsorção física	<i>Burkholderia cepacia</i>	O biocatalisador foi empregado na transesterificação do óleo de jatropa para produção de biodiesel utilizando etanol comercial	(SHAH; GUPTA, 2007)

Fonte: Próprio autor.

(Continua)

Tabela 6: Estudos empregando diferentes suportes e métodos de imobilização de lipases.

(conclusão)

Suporte	Método de imobilização	Enzima	Resultado	Referência
Hidrotalcita e zeólitas	Adsorção física	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	A lipase imobilizada foi capaz de catalisar a transesterificação do óleo de cozinha com metanol para produzir ésteres metílicos	(YAGIZ; KAZAN; AKIN, 2007)
Membrana de algodão	Adsorção física e aprisionamento	<i>Candida sp.</i>	A estabilidade operacional da lipase imobilizada foi superior a 20 dias na síntese do biodiesel	(NIE et al., 2006)
Aerogel de sílica	Encapsulação	<i>Burkholderia cepacia</i> , <i>Candida antarctica</i>	Os dois biocatalisadores mostraram-se adequados para aplicação na transesterificação do óleo de girassol com acetato de metila	(ORÇAIRE; BUISSON; PIERRE, 2006)
Sepabeads	Encapsulação	<i>Candida rugosa</i>	A lipase imobilizada apresentou valores elevados de hidrólise do azeite de oliva em processo batelada	(PRAZERES; GARCIA; CABRAL, 1993)
Resina acrílica	Ligação covalente	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	A preparação enzimática demonstrou ser bastante estável e ativa na reação de transesterificação do óleo de soja	(RODRIGUES et al., 2010)
SiO ₂ -quitosana	Ligação covalente	<i>Candida rugosa</i>	A estabilidade térmica da lipase imobilizada apresentou um aumento de aproximadamente 9 vezes em relação à enzima livre.	(SIMÕES et al., 2011)

Fonte: Próprio autor.

As principais características que devem ser observadas na escolha de um suporte que, posteriormente poderá afetar a qualidade do biocatalisador imobilizado são (CARVALHO; LIMA; SOARES, 2014; MOHAMAD et al., 2015):

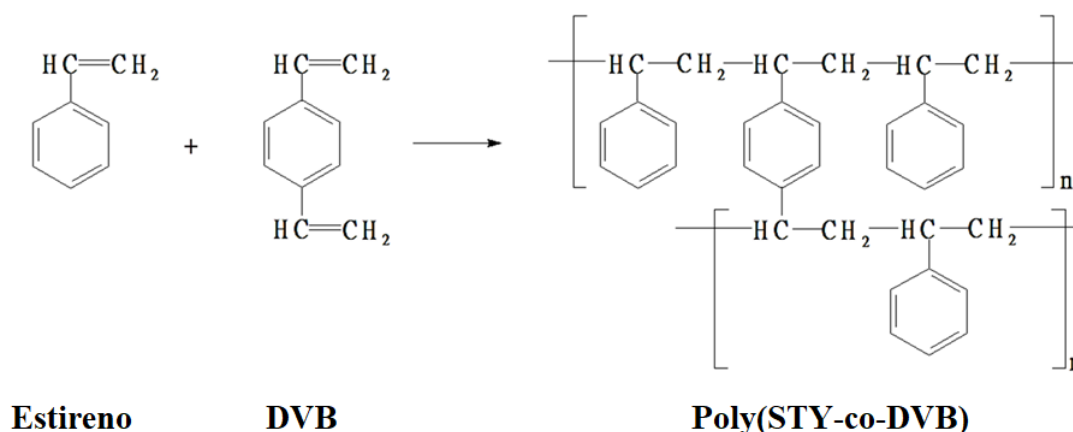
- Químicas: estabilidade química, grupos funcionais, composição da superfície do material, composição química e micro efeitos (pH, carga da superfície, natureza hidrofóbica e hidrofílica, efeito redutor e a presença de íons metálicos);
- Mecânicas: diz respeito ao comportamento sob compressão, tamanho da partícula, resistência à compactação quando operando em reatores de leito fixo, abrasão quando operando em reatores agitados e velocidade de sedimentação quando operando em reatores de leitos fluidizados;
- Morfológicas: associadas à porosidade do suporte, podendo ter baixa área superficial (não porosos), elevada área superficial (porosos), estrutura em gel, diâmetro e volume de poro acessíveis na matriz.

3.7 SUPORTES POLIMÉRICOS

Dentre os diferentes tipos de suportes sólidos para imobilização de enzimas, os suportes poliméricos estão sendo muito empregados, visto que é possível controlar parâmetros importantes à imobilização, como tamanho de partícula, porosidade, tamanho e volume de poros, além da ampla gama de polímeros com elevada estabilidade química e térmica (CANEVAROLO JR., 2006).

Uma opção que apresenta grande potencial de utilização é o poli(estireno-co-divinilbenzeno), objeto de diversos estudos para imobilização de diferentes enzimas e aplicações variadas (DIZGE; KESKINLER, 2008; FAN et al., 2014; HATTORI; SUDOL; EL-AASSER, 1993; IZQUIERDO et al., 2014; SILVA et al., 2018b; VILLENEUVE et al., 2000). Sua forma estrutural com seus monômeros está representada na Figura 3.

Neste caso, o divinilbenzeno atua como agente reticulante na síntese, tais agentes são moléculas que apresentam baixa massa molar e grupos funcionais reativos, com capacidade de viabilizar ligações inter ou intracadeias poliméricas. Dependendo da natureza do reticulante, as principais interações formadas na rede são ligações covalentes ou iônicas (BERGER et al., 2004; GONSALVES et al., 2011).

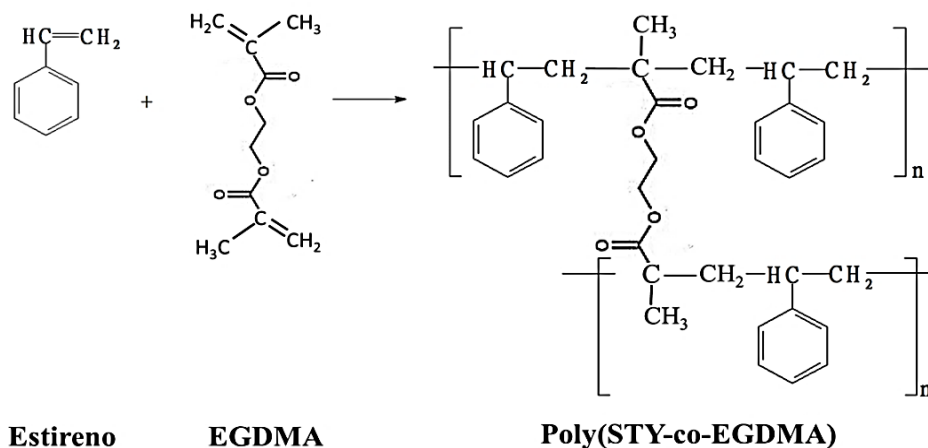
Figura 3: Esquema representativo da formação do copolímero de STY-DVB.

Fonte: (BENTO, 2015).

O estudo de polímeros ramificados e reticulados têm recebido bastante atenção de estudiosos no assunto, devido suas características especiais e a possibilidade de alteração em suas propriedades. Um exemplo é a polimerização radicalar, em que é possível sintetizar polímeros reticulados utilizando um monômero que contenha em sua estrutura, pelo menos, duas duplas ligações carbono-carbono. Este monômero secundário, recebe o nome de agente reticulante. Quando ocorre a incorporação do agente reticulante à cadeia polimérica em crescimento, uma das duplas ligações carbono-carbono permanece disponível, possibilitando a ligação com uma segunda cadeia polimérica em crescimento. Como uma cadeia pode conter várias duplas ligações disponíveis, a estrutura final do polímero pode ser bastante complexa (SANTOS, 2015).

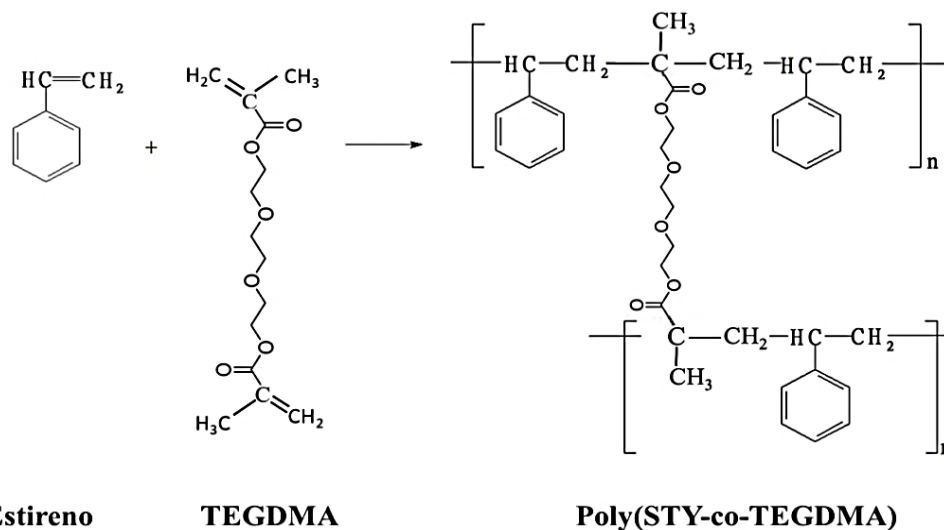
Visto que a modificação morfológica do suporte pode melhorar sua eficiência na imobilização da enzima, o presente trabalho visa estudar a influência do agente reticulante nas características finais do suporte polimérico à base de estireno magnetizado. Serão testados: Divinilbenzeno (DVB), Etilenoglicol dimetacrilato (EGDMA), Trietenoglicol dimetacrilato (TEGDMA) e Triacrilato de trimetilolpropano (TMPTA). As Figuras 4, 5 e 6 ilustram esquemas representativos da formação desses copolímeros.

Figura 4: Esquema representativo da formação do copolímero de STY-EGDMA.



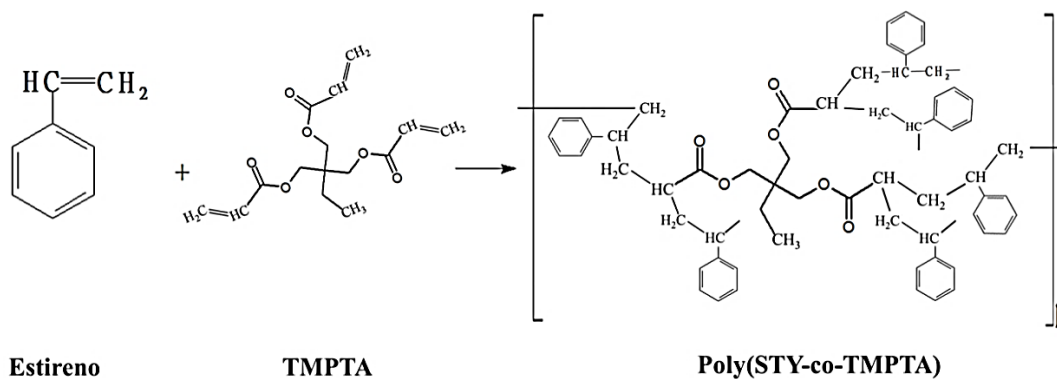
Fonte: Próprio autor.

Figura 5: Esquema representativo da formação do copolímero de STY-TEGDMA.



Fonte: Próprio autor.

Figura 6: Esquema representativo da formação do copolímero de STY-TMPTA.



Fonte: Próprio autor.

Suportes híbridos-poliméricos são bastante estudados, e apresentam uma combinação de propriedades que, por sua vez, não são encontradas em materiais convencionais. Híbridos orgânico-inorgânicos podem ser facilmente preparados e modificados, apresentam diversas possibilidades de combinações entre os componentes disponíveis, o que confere características específicas ao material produzido, como, propriedades mecânicas, controle da porosidade e ajuste no balanço hidrofílico/hidrofóbico, dependendo da aplicação desejada (PEREIRA, 2014).

Materiais híbridos podem ser empregados na extração de cátions metálicos em soluções aquosas ou não aquosas, catálise, trocadores iônicos, cromatografia, uso industrial, entre outros. Dentre estes, destaca-se a classe dos compósitos poliméricos magnéticos (BENTO, 2015; PEREIRA, 2014).

3.8 POLÍMEROS

Os polímeros são formados por vários átomos conectados entre si, formando longas cadeias. Os átomos na cadeia principal geralmente são carbono, oxigênio, nitrogênio ou enxofre, combinados em uma configuração única para cada polímero. Outros átomos ligados à cadeia principal do polímero, podem ser: hidrogênio, carbono, oxigênio, cloro, flúor e / ou bromo (WAGNER; MOUNT; GILES, 2014).

Cada polímero possui uma disposição espacial única de átomos, composta por muitas (poli) unidades de repetição (meros) ligadas entre si com propriedades físicas e reológicas específicas, resultando em um material com características e desempenho distinto para cada aplicação, como resistência ao impacto, à tração e flexão, ao calor, cor x transparência, propriedades elétricas, entre outras. Tais propriedades têm relação com o tipo do monômero, com o número médio de unidades de repetição por cadeia e com o tipo de ligação covalente presentes na matriz polimérica (CANEVAROLO JR., 2006; WAGNER; MOUNT; GILES, 2014).

Os polímeros são classificados em três grandes grupos: plásticos, borrachas e fibras. Os polímeros com elevada massa molar recebem o nome de plásticos, têm a característica de serem sólidos como produto final e são subdivididos em termoplásticos e termofixos. Os termoplásticos podem ser repetidamente amolecidos e solidificados pela adição ou remoção de calor, permitindo que os materiais sejam processados por extrusão, moldagem por injeção e outros equipamentos de processamento de fusão, por várias vezes. Os termorrígidos são

aquecidos para acelerar uma reação de reticulação química chamada cura, na qual uma nova espécie química é formada em um sólido que não se funde quando aplicado calor (WAGNER; MOUNT; GILES, 2014).

As borrachas são elastômeros naturais ou sintéticos, que podem estar cruas, vulcanizadas ou regeneradas. Enquanto que as fibras são termoplásticos orientados na direção da cadeia principal e possuem, obrigatoriamente, comprimento (L) cem vezes maior que o diâmetro (D) ($L/D > 100$) (CANEVAROLO JR., 2006).

Os polímeros ainda podem ser classificados quanto à sua estrutura química, sendo compostos apenas por cadeias carbônicas ou por cadeias heterogêneas; quanto ao método de preparação, por polimerização por adição ou por condensação e quanto ao comportamento e desempenho mecânico (CALLISTER J. W. D., 2002; CANEVAROLO JR., 2006).

A produção de um determinado polímero exige a escolha de um método adequado, que possibilite um bom controle de massa e de distribuição de tamanho de partículas, assim como a facilidade de manuseio e de processamento da massa polimérica formada. Os principais métodos de polimerização são: em massa, em solução, em suspensão e emulsão (CANEVAROLO JR., 2006; CARRAHER, 2010; FRIED, 2003).

3.8.1 Polimerização em Massa

A polimerização em massa é o método mais simples, de baixo custo, contendo apenas monômero e iniciador. O progresso da polimerização pode ser observado pelo aumento da viscosidade do meio reacional (FRIED, 2003).

Sua principal vantagem é a qualidade do produto final, apresentando excelentes propriedades e baixa quantidade de impurezas. No entanto, possui como desvantagem, o difícil controle da temperatura do meio durante a reação, visto que a reação de polimerização é exotérmica. Devido à esse fator, pontos de superaquecimento podem surgir durante a síntese, o que provoca um desequilíbrio no crescimento da cadeia, aumentando a velocidade de término da reação, resultando em um polímero com ampla distribuição de massa molar (CANEVAROLO JR., 2006; FRIED, 2003).

3.8.2 Polimerização em Solução

Assim como na polimerização em massa, na polimerização em solução são empregados monômero e iniciador, porém, com o intuito de melhorar a distribuição da temperatura, é adicionado um solvente, inicialmente solúvel ao meio. No entanto, com o decorrer da reação, o polímero formado poderá ser solúvel ou não ao meio reacional. Caso seja solúvel, o produto final é uma solução do polímero no solvente, e normalmente é empregado desta forma. Se o polímero sintetizado for insolúvel ao meio, recebe a denominação de polimerização em lama ou com precipitação, e neste caso, o polímero é separado do meio reacional, seco e granulado (CANEVAROLO JR., 2006).

Um importante fator é a escolha do solvente, visto que este deve apresentar as seguintes características: ser um diluente inerte; facilitar a mistura dos componentes do meio, reduzindo a taxa de aumento da viscosidade com o decorrer da reação de polimerização (FRIED, 2003).

Uma desvantagem deste método é justamente a utilização de solventes, que além de serem substâncias tóxicas, elevam o custo da produção. Em geral são reações mais lentas devido a diluição dos monômeros, ocasionando baixo rendimento operacional (CANEVAROLO JR., 2006; MANO; MENDES, 1999).

3.8.3 Polimerização em Emulsão

Nesta técnica de polimerização um agente emulsificante é adicionado para manter o monômero disperso em água, formando micelas (contendo extremidades hidrofóbicas e hidrofílicas). Em geral, esse sistema reacional é constituído pelos seguintes componentes: monômero(s), meio de dispersão, agente emulsificante, iniciador solúvel em água, e, eventualmente, um agente de transferência (CANEVAROLO JR., 2006). A polimerização ocorre dentro das micelas gerando um produto na forma de pó fino.

A polimerização em emulsão é amplamente utilizada comercialmente para a produção de uma variedade de polímeros. As vantagens deste método são a utilização de água como meio dispersante, facilidade de homogeneização, poucas reações laterais e obtenção de um polímero de elevado peso molecular. Como desvantagens estão a necessidade de um agente coagulante para precipitar o polímero, a dificuldade de purificação do produto final e a necessidade de um iniciador hidrossolúvel (MANO; MENDES, 1999).

3.8.4 Polimerização em Suspensão

Na polimerização em suspensão, o iniciador é previamente dissolvido no monômero e em seguida adicionado à uma solução aquosa contendo o agente de suspensão. Quando iniciada a agitação do meio reacional, o agente de suspensão dispersa o monômero no formato de pequenas gotas, estabilizando-as. Como produto final são obtidas pérolas com dimensões de 0,05 a 0,25 mm, que devem ser lavadas e secas para posterior utilização (CANEVAROLO JR., 2006).

Os iniciadores mais empregados nesta técnica são: peróxidos (peróxidos de benzoíla, diacetil, lauril, e terc-butil), compostos do tipo azo (Azobisisobutironitrila - AIBN) e iônicos (alquilas de alumínio e antimônio, cloreto de titânio e crômio, e alguns óxidos) (FRIED, 2003).

A concentração de iniciador influencia na massa molar e na distribuição do tamanho das partículas do polímero, visto que, quanto maior a concentração do iniciador maior será a taxa de polimerização, provocando a formação de cadeias poliméricas de menor tamanho (menor massa molar). Além disso, a elevada taxa de polimerização contribui com o aumento da viscosidade do meio e propicia o mecanismo da coalescência. O mesmo efeito é observado pelo aumento da temperatura, que eleva a taxa de polimerização e contribui para o aumento da viscosidade reacional (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

O agente de suspensão, na sua grande maioria é constituído por polímeros polares e atua diminuindo a tensão interfacial entre as gotas de monômero e a água, além de formar uma fina camada sobre as gotas, protegendo-as da coalescência. O poli(álcool vinílico) (PVA) é um dos estabilizantes mais utilizados em polimerização em suspensão (ALCÁZAR et al., 2017; MACHADO; LIMA; PINTO, 2007). A concentração do agente de suspensão é um fator importante para a polimerização, visto que pode influenciar a estabilidade da reação na sua fase inicial, atuando sobre as pequenas gotas formadas, e conseqüentemente estabilizando as partículas obtidas.

Outro fator que tem grande influência sobre o produto final da síntese, é a agitação do meio reacional, visto que, quanto maior a frequência da agitação, maior será a “quebra” das gotas, favorecendo assim a formação de gotas menores, e conseqüentemente partículas poliméricas menores (MACHADO; LIMA; PINTO, 2007).

De acordo com a literatura, o emprego da polimerização em suspensão é uma das melhores alternativas para a incorporação de partículas magnéticas. As principais vantagens

desta técnica, em comparação aos outros métodos de polimerização são: a fácil remoção de calor, bom controle da temperatura, aumento da viscosidade pouco relevante, fácil manuseio e isolamento do produto obtido, baixos níveis de impurezas no polímero formado e o baixo custo do processo (ALCÁZAR et al., 2017; MACHADO; LIMA; PINTO, 2007). Em vista do exposto, esta técnica foi selecionada para o desenvolvimento do presente trabalho.

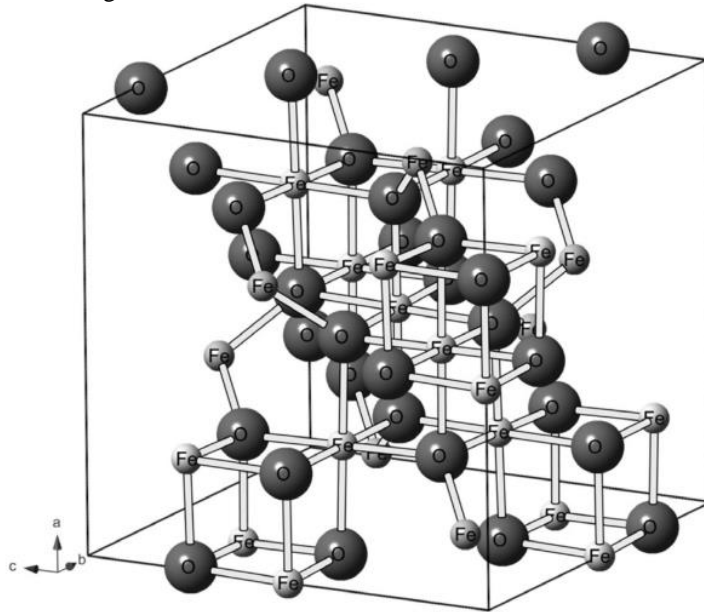
3.9 COMPOSTOS MAGNÉTICOS

Um material apresenta propriedades magnéticas em decorrência do momento magnético dos elétrons de seus átomos, que têm origem nas camadas eletrônicas semi-preenchidas. Destacam-se os metais de transição da série do ferro (elementos com a camada 3d semi-preenchida): Fe, Co, e Ni, e os que possuem a camada 4f semi-preenchida: Nd, Sm, Gd e Dy (CULLITY; GRAHAM, 2009).

Os nanomateriais magnéticos tem atraído atenção considerável devido às suas propriedades únicas. Estão sendo aplicados com sucesso em baterias de íon lítio, catalisadores de supercapacitores, liberação de agentes terapêuticos para tecidos específicos, marcação e classificação de células, bem como na separação de produtos bioquímicos. As nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4 e Fe_2O_3) são especialmente interessantes para aplicações biomédicas, visto que apresentam algumas propriedades, tais como, biocompatibilidade, superparamagnetismo, pequeno tamanho e baixa toxicidade. Além disso, podem ser utilizadas como suportes para o preparo de biocatalisadores, devido sua facilidade de recuperação do meio reacional (MIJONE, 2014; SARANYA et al., 2015; SILVA, 2017; SILVA et al., 2018b; VALENZUELA et al., 2009).

A magnetita (Fe_3O_4) é um excelente material magnético entre os óxidos de ferro. É um mineral ferrimagnético, contendo íons de Fe em dois estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+} . Como pode ser observado na Figura 7, trata-se de uma estrutura cúbica, de espinélio invertida, na qual o oxigênio forma um envoltório fechado de face centrada (FCC), com os íons de O^{2-} coordenados tanto a íons Fe^{2+} quanto Fe^{3+} (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013). Os íons Fe^{2+} ocupam os interstícios octaédricos, sendo responsáveis pela magnetização de saturação e pelo comportamento magnético do material. Já os íons de Fe^{3+} são divididos igualmente entre as posições tetraédricas e octaédricas, não permitindo a existência de um momento magnético resultante destes íons (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013).

Figura 7: Estrutura cristalina da magnetita.



Fonte: (OLIVEIRA; FABRIS; PEREIRA, 2013)

A magnetita tem sido amplamente aplicada em diferentes áreas, como em ferrofluido, catálise, pigmentos, meios magnéticos de armazenamento, proteção ambiental, separação celular e diagnóstico clínico. Várias estruturas de magnetita, incluindo nanocristalinas, partículas, fios, bastões, tubos e nano folhas têm sido sintetizadas com sucesso, empregando diferentes métodos (MIJONE, 2014; SARANYA et al., 2015).

Os compósitos poliméricos magnéticos são formados basicamente por uma matriz polimérica e cargas de partículas magnéticas, geralmente magnetita (Fe_3O_4), que possui forte propriedade magnética e baixa toxicidade, além de fácil obtenção. A magnetita pode ser obtida por diferentes meios, como a decomposição térmica, microemulsão e co-precipitação. A co-precipitação é a técnica mais difundida devido à facilidade na execução e baixo custo (BENTO, 2015; BENTO et al., 2017), sendo portanto selecionada para a obtenção da magnetita no presente trabalho.

Partículas magnéticas, quando introduzidas na matriz polimérica durante a síntese do polímero, apresentam vantagens em relação aos demais suportes, pois podem ser separadas facilmente pela simples aplicação de um campo magnético, o que facilita o procedimento de imobilização, seu manuseio na fase de reação e posteriormente nas etapas de separação e recuperação. A separação magnética evita a perda da atividade enzimática observada nas técnicas clássicas de separação, como centrifugação ou filtração, prejudicando sua estrutura tridimensional, em função por exemplo, da compactação das partículas (HALLING;

DUNNILL, 1980; JUDY-AZAR; MOHEBBI, 2015; PIETERS; BARDELETTI, 1992; ROBINSON; DUNNILL; LILLY, 1973).

Materiais magnéticos foram utilizados para imobilizar enzimas pela primeira vez por Robinson et al. (1973), que estudaram as propriedades dos biocatalisadores magnéticos em reatores enzimáticos imobilizados, através da imobilização de duas enzimas (α -quimotripsina e β -galactosidase) em suportes de óxido de ferro, ativado com amino silano e um composto de óxido de ferro-celulose ativado com brometo de cianogênio.

Em outro trabalho, Dekker (1989) relatou a imobilização da lactase em suporte magnético, obtido pelo tratamento da magnetita com polietilenoimina e reticulação com glutaraldeído. Em um reator batelada, a enzima imobilizada hidrolisou completamente a lactose, apresentando elevada estabilidade.

3.10 PLANEJAMENTO DE EXPERIMENTOS

O planejamento de experimentos é uma importante ferramenta utilizada para otimizar uma variedade de processos da engenharia. Envolve o planejamento e a realização de um conjunto de experimentos para estudar o comportamento de um sistema e determinar os efeitos das variáveis experimentais nesse sistema (MÄKELÄ, 2017).

Os dados adquiridos, contendo as respectivas incertezas e/ou erros, são organizados pelo próprio método. Um modelo matemático é obtido, contendo informações sobre os efeitos das condições experimentais na direção e magnitude da resposta medida. Uma vez que, o modelo determinado seja estatisticamente válido, este pode ser usado para prever futuras observações dentro da faixa de estudo empregada (MÄKELÄ, 2017).

3.10.1 Taguchi

A metodologia Taguchi foi desenvolvida nos anos 80 e baseia-se no uso de matrizes ortogonais. Os projetos permitem quantificar efeitos lineares e combinações de variáveis adequadas para a melhoria do sistema. O Taguchi desenvolve uma metodologia para encontrar configurações ótimas dos fatores de controle e tornar um produto ou processo insensível aos fatores de ruído (quando os testes forem realizados em replicatas) (MÄKELÄ, 2017; XIANSHENG et al., 2011).

Em contraste com outros métodos analíticos, o método de Taguchi determina tanto o resultado ótimo de dados analíticos finitos, quanto os fatores de qualidade dominantes envolvidos na otimização do processo (MÄKELÄ, 2017; XIANSHENG et al., 2011). Acentua a importância em reduzir a variabilidade de um processo em torno de um “valor alvo” estabelecido, ou seja, reforça a necessidade de trazer a média do processo para o valor nominal especificado no projeto (BRANDT; BRANDT; NUNES, 2016) e assim obter sua otimização.

Ao contrário do planejamento fatorial, em que todas as combinações possíveis são testadas, Taguchi emprega um número mínimo de tentativas, analisando pares de combinações, minimizando tempo e reduzindo custos. Pode ser utilizado em diferentes áreas, como na indústria médica, farmacêutica, terapêutica e no controle da poluição (CHAN et al., 2014).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Síntese dos suportes

Para a síntese dos copolímeros foram utilizados como reagentes: álcool polivinílico – PVA 88% hidrolisado – MM 78000 (Polysciences, Inc.), azobisisobutironitrila - AIBN (MIG Química), peróxido de benzoíla – BPO (Hexion Química LTDA), divinilbenzeno – DVB 80% (Sigma-Aldrich®), dimetacrilato de etilenoglicol – EGDMA (Sigma-Aldrich®), dimetacrilato de trietilenoglicol – TEGDMA (Sigma-Aldrich®) e triacrilato de trimetilolpropano – TMPTA (Sigma-Aldrich®), estireno 99 % (Sigma-Aldrich®), heptano 95 % (Cromoline), toluol 99,5 % (Cromoline), metanol 99,8 % (Cromoline) e clorofórmio 99,9% (Synth).

4.1.2 Magnetização dos copolímeros

Como reagentes para a síntese e modificação da magnetita foram utilizados: acetato de etila 99,5 % (Cromoline), hidróxido de sódio 99 % (Synth), cloreto de ferro (II) 99 % (Sigma-Aldrich®), cloreto de ferro (III) pentahidratado 99,5 % (Sigma-Aldrich®), ácido oleico P.A (Cromoline) e etanol 96 % (Cromoline).

4.1.3 Imobilização e determinação da atividade enzimática

Preparação comercial da lipase fúngica B de *Candida antarctica* (CALB), adquirida da Sigma-Aldrich®, foi utilizada para obtenção de biocatalisadores a partir da imobilização nos diferentes copolímeros magnéticos sintetizados. Os demais reagentes utilizados no processo de imobilização foram: polietilenoglicol - PEG MM 1500 (Synth) e heptano 95% (Cromoline).

Para as análises de atividade hidrolítica: dihidrogenofosfato de potássio 99% (Cromoline), etanol 96% (Cromoline), hidrogenofosfato dissódico 99% (Synth), hidróxido de potássio 85% (Synth), butirato de metila 99 % (Sigma-Aldrich®). As análises de atividade de esterificação utilizaram: ácido oleico P.S (Cromoline) e etanol anidro (Synth).

4.2 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados no desenvolvimento do trabalho estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7: Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho.

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/Fabricante
Agitação mecânica	Agitador Mecânico	IKA (IKA Laboratory Equipments)
Análise Textural pelo Método de BET	Analizador Multiponto BET	Quantachrome Instruments - Anton Paar (NOVA, Modelo 4200)
Calorimetria Diferencial de Varredura e Análise termogravimétrica	Calorímetro Diferencial por Varredura	TA Instruments (Modelo Q600 SDT)
Classificação granulométrica	Agitador de peneiras	Spencer (série 11-05)
Determinação da curva de magnetização (Histerese)	Magnetômetro de Amostra Vibrante	VSM modelo PAR4500
Difração de Raios-X	Difratômetro de Raios-X	Malvern Panalytical (Modelo Empyrean)
Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente	Espectrômetro de Emissão Óptica	PerkinElmer Precisely (Modelo Optima 7300DV)
Espectroscopia na região do Infravermelho por Transformada de Fourier	Espectrômetro de Infravermelho	Shimadzu (Modelo IR Prestige-21)
Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X	Espectrômetro por Energia Dispersiva de Raios-X	HITACHI, modelo SwiftED3000
Espectroscopia Vibracional Raman	Espectrômetro Raman	Renishaw 2000

Fonte: Próprio autor.

(Continua)

Tabela 7: Principais equipamentos utilizados durante a realização do trabalho. (conclusão)

Tipo de análise e/ou ensaio	Equipamento	Modelo/Fabricante
Estabilização da temperatura na síntese polimérica	Banho ultratermostático	PHD (BUTH9 1600W)
	Banho termostático	PHD (BTATH9 2000W)
Microscopia Eletrônica de Varredura	Microscópio Eletrônico de Varredura	HITACHI TM3000
Microscopia Óptica Comum	Microscópio Óptico Comum	Opton Microscópios (Modelo TNB-01T-INF-LED)
Síntese das partículas poliméricas	Reator vidro encamisado (0,5 L)	P.H.D (RFVCH0.5)
Teor de umidade	Balança analítica	Shimadzu (Modelo MOC63u)

Fonte: Próprio autor.

4.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.3.1 Purificação dos iniciadores das reações de polimerização: AIBN (azobisisobutironitrila) e BPO (peróxido de benzoíla)

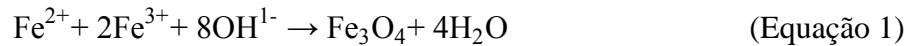
Ambos os iniciadores foram purificados via recristalização. 5 g de AIBN foram adicionados em um erlenmeyer, sendo totalmente solubilizados em 200 mL de metanol sob agitação magnética, por 30 min. Em seguida, a solução foi mantida entre 4 a 6 °C por 4 h, e de -6 a -3 °C por 20 h. Para a purificação do BPO, 25 g foram totalmente solubilizados em 100 mL de clorofórmio sob agitação magnética por 30 min, sendo a solução mantida por 4h entre 4 a 6 °C e de -6 a -3 °C por 44 h.

Os cristais foram filtrados e secos em dessecador utilizando sílica gel como agente desumidificante.

4.3.2 Síntese da Magnetita: Co-Precipitação dos íons Fe^{+2} e Fe^{+3}

Soluções aquosas de $FeCl_2$ 0,6 mol.L⁻¹ e de $FeCl_3 \cdot 4H_2O$ 1,2 mol.L⁻¹ foram misturadas, lentamente, em proporções adequadas em um béquer imerso em banho maria, sob agitação

mecânica. A temperatura do meio reacional foi estabilizada a 65 °C e uma solução aquosa de NaOH 4 mol.L⁻¹ foi adicionada lentamente ao meio, até que a solução resultante atingisse pH 11,0. A Equação 1 mostra a reação ocorrida para a formação da magnetita:



A solução resultante, de coloração negra, foi mantida sob agitação durante 30 min a 65 °C, seguida de repouso sobre um ímã para auxiliar a decantação das partículas magnéticas formadas. A massa negra decantada foi separada e lavada sucessivamente com água ultrapura e solução 1:1 de acetato de etila e água ultrapura, até atingir pH 7,0. O fluido férrico contendo as partículas magnéticas foi filtrado a vácuo e levado à estufa a 60 °C por 18 h (BENTO et al., 2017).

4.3.3 Modificação da superfície da magnetita com ácido oleico

Visando aumentar a hidrofobicidade da magnetita, e assim facilitar sua dispersão na fase orgânica durante a polimerização, foi realizada uma modificação da sua superfície empregando ácido oleico, conforme metodologia descrita por Bento et al. (2017). A magnetita seca foi misturada sob agitação constante em ácido oleico numa proporção (m/v) de 3,25 g de magnetita: 40 mL ácido oleico.

Em seguida foram adicionados 80 mL de água, sendo a mistura mantida sob agitação durante 30 min. A emulsão formada foi filtrada a vácuo e lavada com etanol para remover o ácido oleico residual. As partículas magnéticas modificadas foram levadas à estufa a 60 °C por 18 h para completa secagem, e então adicionadas à polimerização em proporções variadas, estabelecidas posteriormente (LEE; RHO; JUNG, 2002).

4.3.4 Síntese dos copolímeros magnéticos à base de estireno

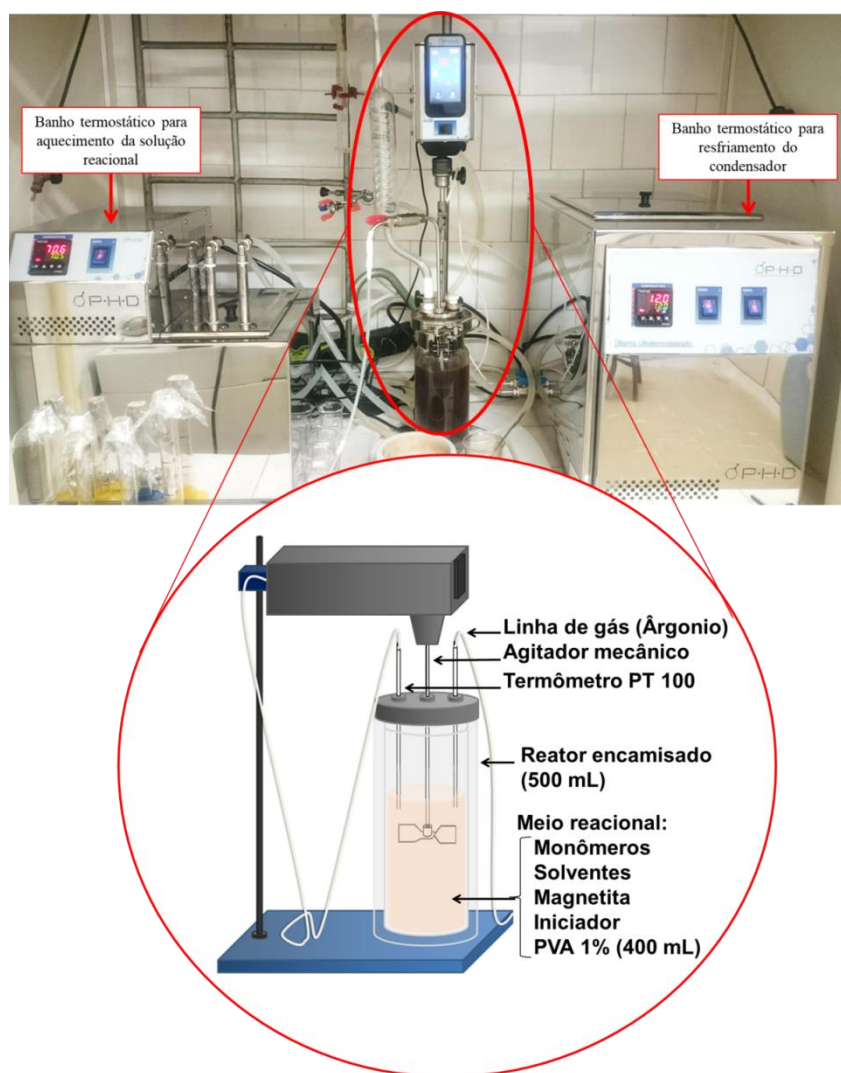
Os copolímeros magnetizados foram sintetizados a partir da técnica de polimerização em suspensão, em reator de vidro encamisado com capacidade de 500 mL (P.H.D. equipamentos para laboratório, modelo RFVCH0.5).

A polimerização foi realizada empregando uma fase orgânica e uma fase aquosa (1:8). A fase orgânica (fase dispersa) foi composta por estireno e um agente reticulante, podendo

ser: divinilbenzeno (DVB) ou dimetacrilato de etilenoglicol (EGDMA) ou dimetacrilato de trietilenoglicol (TEGDMA) ou triacrilato de trimetilopropano (TMPTA). À essa mistura também foram adicionados toluol (solvente de alta afinidade), heptano (solvente de baixa afinidade), AIBN ou BPO como iniciador e magnetita (Fe_3O_4) modificada com ácido oleico macerada, proporcionando características magnéticas ao suporte. A fase aquosa (fase contínua) foi composta por 1 % de PVA (agente de suspensão) dissolvido em 400 mL de água ultrapura. Todos os reagentes foram adicionados em proporções definidas pela metodologia empregada (arranjos ortogonais de Taguchi L9).

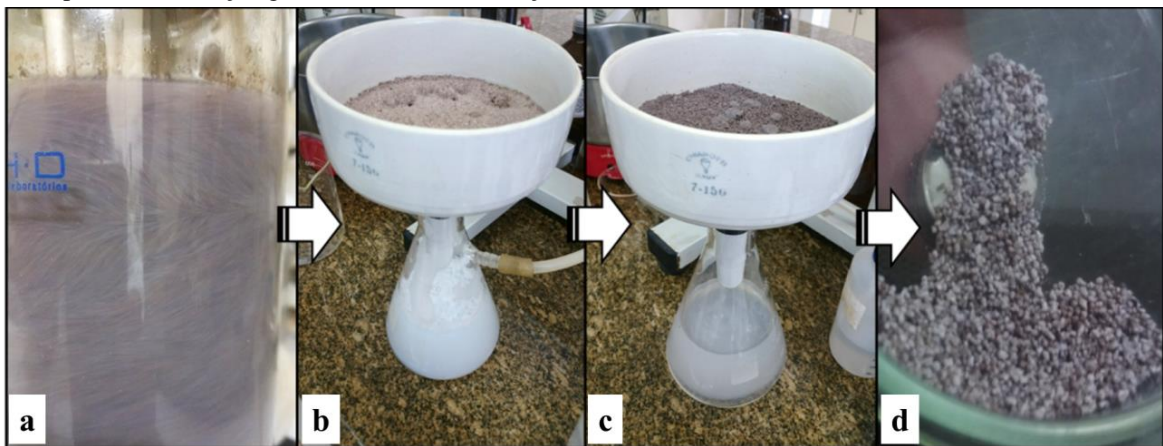
As sínteses tiveram duração de 6h, sob agitação mecânica de 310 rpm, a 70 °C, sendo as duas primeiras horas realizadas sob atmosfera inerte (argônio). A Figura 8 ilustra o aparato experimental empregado.

Figura 8: Esquema experimental empregado para a síntese dos copolímeros.



Após a polimerização, o meio contendo as partículas poliméricas foi filtrado à vácuo e lavado exaustivamente com água ultrapura (UP) à temperatura ambiente e água UP aquecida a 50 °C, acetona e etanol, para remoção da fase aquosa e dos reagentes residuais. Em seguida, o material foi seco em estufa a 60 °C por 18 h, classificado granulometricamente em agitador de peneiras da marca Sppencer (série 11-05) e sua umidade medida em balança Shimadzu (Modelo MOC63u). A Figura 9 mostra as etapas sequenciais para a obtenção do material polimérico magnético final.

Figura 9: Etapas para a obtenção do suporte: a) Polimerização realizada em reator encamisado, b) Filtração para separação do suporte obtido, c) Lavagem das partículas poliméricas e d) Suporte polimérico magnético seco, obtido após a classificação granulométrica e sob a ação de um ímã.



Fonte: Próprio autor

4.3.5 Imobilização da lipase CALB nas matrizes poliméricas sintetizadas

Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) foi imobilizada por adsorção física nos suportes poliméricos previamente embebidos em heptano, em uma proporção de 1:10 (m/v), sendo mantidos sob agitação por 2h. Para cada grama de suporte foram adicionados 0,25 mL da lipase na forma livre e 100 µL de solução aquosa 5 g.L⁻¹ de polietilenoglicol (PEG-1500).

A mistura contendo enzima, suporte e PEG-1500 foi homogeneizada por agitação suave, seguida de contato estático por um período adicional de 18 h a 4°C. A recuperação dos derivados imobilizados foi efetuada por filtração a vácuo, sendo realizadas lavagens sucessivas com heptano até a redução da umidade para valores inferiores a 10%. A umidade do derivado imobilizado foi determinada em balança de umidade Shimadzu (Modelo MOC63u).

4.3.6 Determinação da atividade enzimática dos biocatalisadores

4.3.6.1 Hidrólise do butirato de metila (HBM)

A atividade hidrolítica dos derivados imobilizados foi quantificada pelo método da hidrólise do butirato de metila (FIDALGO, 2014), de acordo com a Equação 2. A reação de hidrólise foi realizada em solução-tampão fosfato 0,025 mol.L⁻¹ (pH 7,0), sob agitação de 150 rpm em shaker a 37 °C. Após 5 minutos de reação, a mistura foi titulada com solução de KOH 0,02 mol.L⁻¹, utilizando fenolftaleína como indicador.

$$\text{Atividade (U.g}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_b) * C * 1000}{t * m} \quad (\text{Equação 2})$$

Em que: V_a = Volume de KOH gasto na titulação da amostra (mL); V_b = Volume de KOH gasto na titulação do branco (mL); C = Concentração da solução aquosa de KOH utilizada na titulação (mol.L⁻¹); t = tempo da reação em minutos e m = massa de biocatalisador (g).

4.3.6.2 Esterificação do oleato de etila (EOE)

A atividade sintética dos biocatalisadores obtidos foi efetuada pela reação de esterificação do ácido oleico com etanol. As sínteses foram conduzidas em frascos de vidro com capacidade total de 100 mL, contendo 11,4 mL de substrato e 0,5 g do derivado imobilizado. Os frascos foram mantidos em shaker à temperatura de 45 °C sob agitação de 150 rpm, com retiradas de alíquotas de 100 µL à cada 10 min. À cada alíquota, foram adicionados 10 mL de etanol 96%, sendo o consumo do ácido oleico quantificado por meio de titulação com hidróxido de potássio 0,04 mol.L⁻¹.

Uma unidade de atividade enzimática de esterificação (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para formar 1 µmol de oleato de etila por minuto de reação sob as condições do ensaio. A atividade sintética foi determinada apenas na região linear do gráfico: concentração do produto *versus* unidade de tempo.

4.3.7 Estabilidade térmica dos biocatalisadores

A estabilidade térmica dos biocatalisadores selecionados foi estudada a partir da hidrólise do butirato de metila, sendo quantificada a atividade hidrolítica residual, após serem incubados em meio heptano a 50 °C por até 240 min. A quantificação foi realizada em tempos pré-determinados.

Os coeficientes de desativação térmica (K_d) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) para os derivados imobilizados foram calculados a partir das Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\ln(A) = \ln(A_0) - K_d * t \quad (\text{Equação 3})$$

$$t_{\frac{1}{2}} = \frac{\ln(2)}{K_d} \quad (\text{Equação 4})$$

Em que: A_0 = atividade inicial e A = atividade residual.

4.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL

4.4.1 Arranjo ortogonal – Taguchi L9

Visando estudar a influência de alguns fatores que interferem no processo de polimerização do suporte e assim obter as melhores condições de síntese para os 4 copolímeros obtidos a partir dos diferentes agentes reticulantes (DVB, EGDMA, TEGDMA e TMPTA), foram realizados experimentos empregando arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).

Para isso foram analisados os seguintes fatores: (A) % de massa dos monômeros (STY+ Reticulante) na mistura monômero/ solvente (m/m); (B) % de reticulante na massa total de monômeros (STY+ Reticulante) (m/m); (C) % de solvente com elevada afinidade/ solvente com baixa afinidade na mistura (massa toluol/ massa heptano) e (D) % de magnetita em relação à massa total de monômeros (STY+ Reticulante) (m/m). Os resultados obtidos foram analisados pelo software Minitab 17.1 (Inc., USA).

As Tabelas 8 e 9 mostram respectivamente, a matriz experimental (L9) empregada para a realização dos experimentos e os níveis de cada fator estudado, bem como sua codificação.

Tabela 8: Matriz experimental (L9) empregada para a realização dos experimentos

Ensaio	Nível codificado				Nível decodificado (%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	1	1	1	1	30	30	40	10
2	1	2	2	2	30	45	50	15
3	1	3	3	3	30	60	60	20
4	2	1	2	3	40	30	50	20
5	2	2	3	1	40	45	60	10
6	2	3	1	2	40	60	40	15
7	3	1	3	2	50	30	60	15
8	3	2	1	3	50	45	40	20
9	3	3	2	1	50	60	50	10

Fonte: Próprio autor

Tabela 9: Níveis dos fatores estudados na L9 e sua codificação.

Fator Codificado	Fator Decodificado	Níveis		
		1	2	3
A	% de massa dos monômeros na mistura monômero/ solvente	30	40	50
B	% de reticulante na massa total de monômeros	30	45	60
C	% de solvente com elevada afinidade/ solvente com baixa afinidade na mistura	40	50	60
D	% de magnetita em relação à massa total de monômeros	10	15	20

Fonte: Próprio autor

As variáveis resposta estudadas no presente trabalho foram o rendimento total de polimerização (η_{total}) e o rendimento em partículas úteis (η_{PU}), classificadas na faixa granulométrica 80-24 mesh, apontadas como ideal para a imobilização de lipases (BENTO, 2015).

O rendimento total (η_{total}) e em partículas úteis (η_{PU}) foi calculado segundo as Equações 5 e 6, respectivamente.

$$\eta_{\text{total}} = \frac{m_{\text{final}}}{m_{\text{inicial}}} * 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Em que: η_{total} é o rendimento total da polimerização, m_{final} é a massa das partículas poliméricas obtida após a síntese, subtraída a massa média de magnetita inserida (39,45 % da massa inicial de magnetita) e m_{inicial} é a massa total dos monômeros (STY + Reticulante) empregada no início da polimerização.

$$\eta_{\text{PU}} = \frac{m_{\text{PU}}}{m_{\text{total}}} * 100 \quad (\text{Equação 6})$$

Em que: η_{PU} é o rendimento da síntese com partículas na faixa granulométrica entre 80-24 mesh, m_{PU} é a massa das partículas obtidas após a polimerização nessa faixa e m_{total} é a massa total de copolímero obtido na síntese.

As partículas poliméricas foram caracterizadas empregando técnicas de análises específicas, visando determinar suas propriedades morfológicas, estruturais, magnéticas e térmicas, bem como o desempenho dos suportes na imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB).

4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS MAGNÉTICOS

Os suportes sintetizados foram caracterizados empregando técnicas de análises específicas, como EDX, FT-IR, Raman, ICP-OES, DRX, Histerese, DSC, TGA, Ângulo de contato, Densidade, MEV, MOC, BET e Grau de intumescimento.

4.5.1 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

A técnica de espectroscopia por energia dispersiva de raios-X (EDX) se baseia na emissão de raios-X sobre a amostra, sendo que cada elemento da tabela apresenta um ângulo diferente de dispersão na reflexão dos raios-X. Desta forma, é possível determinar qualitativamente e semi quantitativamente os elementos presentes na amostra.

A análise dos polímeros sintetizados foi realizada no acessório de EDX (HITACHI, modelo SwiftED3000) acoplado ao microscópio eletrônico de varredura HITACHI TM300, no qual foram realizadas as análises de MEV. A tensão aplicada sobre a amostra foi de 15 kV durante 20 s, sendo realizada uma análise pontual.

4.5.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

A espectrometria de infravermelho fundamenta-se nas mudanças de estados energéticos vibracionais causados pela interação fóton-matéria na região do infravermelho (10000 a 100 cm^{-1}), baseando-se na absorção da radiação de diferentes frequências. Identifica grupos funcionais em amostras orgânicas ou inorgânicas, a partir dos valores peculiares de absorção de cada elemento.

As análises dos suportes poliméricos foram realizadas em um espectrômetro da marca Shimadzu (Modelo IR Prestige-21), alocado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena (DEMAR/EEL-USP). Foi utilizado o método de transmissão na região espectral de 4500 a 450 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , sendo as amostras preparadas em cristais de KBr.

4.5.3 Espectroscopia Raman

As amostras foram analisadas por espectroscopia Raman em um equipamento Renishaw 2000, equipado com laser de argônio, operando com um comprimento de onda de $514,5\text{ nm}$ na região de 1800 a 250 cm^{-1} .

Por se tratar de uma análise não destrutiva e direta, não foi necessário realizar qualquer tratamento na amostra. O equipamento encontra-se alocado no Laboratório de Materiais do Instituto Tecnológico da Aeronáutica – LABMAT / ITA.

4.5.4 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

A técnica de ICP-OES é baseada na indução da amostra por uma fonte de plasma de argônio (entre 7000 e 10000 K), que por sua vez, foi totalmente ionizada pelos ácidos no processo da digestão. Antes de ser injetada no plasma, a amostra passa por uma câmara de nebulização, e ao entrar em contato com o mesmo, os elétrons dos metais presentes na amostra são induzidos à excitação, emitindo radiação em comprimentos de ondas específicos. Os dados obtidos são comparados aos padrões e a concentração é determinada de acordo com a calibração do equipamento.

Para a realização desta análise foi utilizado um espectrômetro da marca PerkinElmer Precisely (Modelo Optima 7300DV), alocado no Departamento de Engenharia Química da EEL-USP, no Laboratório de Caracterização Analítica e Tratamento de Efluentes.

O equipamento foi calibrado com padrões de diferentes concentrações de Fe. Foram utilizadas duas curvas de calibração, uma de concentração elevada ($1-5 \text{ mg Fe. L}^{-1}$) e outra de concentração baixa ($1-100 \text{ mg Fe.L}^{-1}$). Antes das análises, as amostras poliméricas foram digeridas empregando duas metodologias:

1) Água-régia: foram adicionados à um balão volumétrico, 6 mL de de ácido clorídrico (HCl), 2 mL de ácido nítrico (HNO_3) e avolumado para 50 mL com água deionizada, permanecendo sob agitação por cerca de 10 minutos;

2) Água-régia + HF: em um balão volumétrico foram adicionados 6 mL de de ácido clorídrico (HCl), 2 mL de ácido nítrico (HNO_3), 2 mL de ácido fluorídrico (HF) e avolumado para 50 mL com água deionizada, permanecendo sob agitação por 10 minutos.

4.5.5 Difratometria de Raios-X (DRX)

A identificação das fases presentes nos suportes foi realizada através da difratometria de raios-x (DRX), utilizando um difratômetro da marca Malvern Panalytical (Modelo Empyrean), alocado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena (DEMAR/EEL-USP).

Os parâmetros da análise foram 2θ entre 10° e 90° , tempo por passo de 25 s e passo de $0,026^\circ$. A identificação das fases foi conduzida no software Highscore 3.0 da marca Panalytical.

4.5.6 Determinação da curva de magnetização (Histerese)

Para verificar as propriedades magnéticas dos suportes sintetizados, as partículas poliméricas foram analisadas em um Magnetômetro de Amostra Vibrante (VSM) modelo PAR4500, alocado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena (DEMAR/EEL-USP).

A curva de magnetização (curva de histerese) é gerada a partir de um gráfico obtido experimentalmente, que relaciona a indução magnética com a intensidade do campo magnético, indicando a saturação de magnetização do material analisado. O campo magnético aplicado foi de: $-90,0 < |H| < 90,0$ kOe, sob temperatura ambiente.

4.5.7 Calorimetria diferencial de varredura (DSC)

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) mede fluxos de calor associados aos eventos térmicos verificados em materiais ao longo de uma varredura de temperatura. Tais medidas fornecem informações qualitativas e quantitativas sobre transformações físicas e químicas que envolvem processos endo ou exotérmicos, incluindo transições vítreas, mudanças de fase, fusão, cristalização e pureza de materiais. O parâmetro investigado está relacionado com as variações de energia que ocorrem em cada processo, ou seja, tem-se um registro da energia fornecida à amostra em função do tempo.

As análises de DSC para os diferentes copolímeros sintetizados foram realizadas na balança termogravimétrica DSC-TGA da marca TA Instruments (Modelo Q600 SDT), alocada no Laboratório de Combustão e Captura de Carbono da Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Engenharia de Guaratinguetá (LC₃/UNESP/FEG), na faixa de temperatura de 30 a 600°C . As amostras foram submetidas à uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C}/\text{minuto}$, sob um fluxo de 100 mL/min de nitrogênio.

4.5.8 Análise termogravimétrica (TGA)

Na análise termogravimétrica, a variação de massa resultante em função da temperatura, fornece informações sobre a composição e a estabilidade térmica da amostra inicial, dos compostos intermediários, bem como do composto final. É possível determinar quantitativamente e estudar os processos de desidratação, decomposição térmica e oxidativa, assim como acompanhar diferentes reações, transições de fase e transformações físico-químicas.

As amostras poliméricas também foram caracterizadas na balança termogravimétrica DSC-TGA da marca TA Instruments (Modelo Q600 SDT), alocada no LC₃/UNESP/FEG, empregando as mesmas condições da análise de DSC.

4.5.9 Ângulo de contato

A análise goniométrica permite determinar características hidrofílicas e hidrofóbicas de materiais sólidos. O ângulo de contato entre o fluido e o sólido foi determinado com auxílio de uma câmera de 20.7 Mpx e lente com abertura f/2.0 de modelo Sony IMX214 Exmor RS, do tipo CMOS com LED, operada em condições ambientes de temperatura e pressão.

Uma gota de água deionizada (10 µL) foi depositada na superfície da amostra e o ângulo formado a partir do contato da gota com a superfície do sólido foi calculado até completa absorção da água pelo material. As imagens foram capturadas a cada 5 min e analisadas no programa ImageJ.

4.5.10 Densidade

4.5.10.1 Densidade Relativa de Sólidos (Ds)

A densidade relativa dos suportes (Ds) foi determinada utilizando heptano como solvente em um balão volumétrico de 10 mL. As massas e os volumes dos copolímeros e do solvente foram calculados a partir das Equações 7 a 9 (TEIXEIRA et al., 2017).

$$d_{\text{heptano}} = \frac{m_{1\text{heptano}}}{V_{1\text{heptano}}} \quad (\text{Equação 7})$$

$$m_{2\text{heptano}} = m_{\text{total}} - (m_{\text{polímero}} + m_{\text{balão vazio}}) \quad (\text{Equação 8})$$

$$D_s = d_{\text{polímero}} = \frac{m_{\text{polímero}}}{\left[V_{\text{total}} - \left(\frac{m_{2\text{heptano}}}{d_{\text{heptano}}} \right) \right]} \quad (\text{Equação 9})$$

Em que: d_{heptano} = densidade do heptano ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); $m_{1\text{heptano}}$ = massa do heptano no balão volumétrico de 10 mL (g); $V_{1\text{heptano}}$ = 10 mL (volume do solvente no balão volumétrico); m_{total} = massa do balão vazio ($m_{\text{balão vazio}}$) + massa do suporte ($m_{\text{polímero}}$) + massa do heptano ($m_{2\text{heptano}}$) (g); V_{total} = 10 mL e D_s = densidade relativa do polímero.

4.5.10.2 Densidade Aparente (Da)

A determinação da densidade aparente (em massa seca), consiste na medida do volume e da massa de uma determinada amostra sólida, através da razão entre as duas grandezas. Esta análise foi realizada para os diferentes copolímeros sintetizados, utilizando também um balão volumétrico de 10 mL aferido.

4.5.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O microscópio eletrônico de varredura (MEV) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação e resolução. O princípio de funcionamento do MEV consiste na emissão de feixes de elétrons por um filamento capilar de tungstênio (eletrodo negativo), mediante a aplicação de uma diferença de potencial, que permite a aceleração dos elétrons. O feixe de elétrons é atraído pelo eletrodo positivo e alinhado em direção à abertura da objetiva.

As micrografias das superfícies dos suportes magnéticos foram realizadas utilizando microscópio eletrônico de varredura HITACHI TM3000, com sistema de microanálise EDS, alocado no Departamento de Materiais da Escola de Engenharia de Lorena (DEMAR/EEL-USP), aplicando ampliações de 100x. Não foi necessário a metalização das amostras.

4.5.12 Microscópio Óptico Comum (MOC)

O microscópio óptico comum (MOC) é um equipamento capaz de produzir imagens de alta ampliação, utilizando a refração da luz oriunda de uma série de lentes, dotadas, ou não, de filtros multicoloridos e/ou ultravioleta. É constituído por uma parte óptica, para ampliação das imagens, e uma parte mecânica, para realizar a focagem da amostra.

As micrografias das superfícies dos suportes magnéticos foram realizadas utilizando microscópio óptico comum da marca Opton Microscópios (Modelo TNB-01T-INF-LED), alocado no Laboratório de Engenharia de Microalgas.

4.5.13 Análise Textural pelo Método de BET por múltiplos pontos (Braunauer, Emmet e Teller)

O analisador BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) pode realizar medidas de área superficial, micro e mesoporosidade, distribuição de tamanho de poros, densidade por absorção física e caracterização de catalisadores por adsorção química.

Neste trabalho, os copolímeros magnéticos foram caracterizados quanto à sua área superficial, diâmetro e volume de poros empregando a técnica de adsorção-dessorção física de nitrogênio. Essa técnica consiste na passagem de uma mistura de N₂ (g) e He (g) sobre a amostra sólida à pressões relativas. O nitrogênio adsorvido em cada pressão parcial, causa alteração na composição do gás de saída, que é detectada por condutividade térmica. Após a adsorção, o N₂ (g) é desorvido pelo aquecimento da amostra, provocado pela retirada do frasco contendo nitrogênio líquido, sendo registrados os picos de adsorção e desorção. As amostras foram pré-tratadas a 105 °C, visando eliminar possíveis traços de solventes e outros voláteis.

A análise foi realizada no equipamento Quantachrome Instruments - Anton Paar (NOVA, Modelo 4200), alocado na Central Analítica da Universidade de Campinas.

4.5.14 Determinação do Grau de Intumescimento (GI %)

A determinação do Grau de Intumescimento (GI %) foi realizada com o intuito de verificar a capacidade dos diferentes suportes sintetizados em absorver um determinado solvente.

Para a realização do teste foram utilizados 10 mL de heptano e 0,5 g de suporte seco. Após 24 h da imersão do suporte em heptano sob temperatura ambiente, o mesmo foi filtrado, sendo registrado o valor de sua massa intumescida (M_i). Posteriormente, o suporte foi seco em estufa a 100 °C por 24 h e, após resfriado, o valor de sua massa seca (M_s) foi determinado.

O GI % foi calculado de acordo com a Equação 10 (SOUTO-MAIOR et al., 2008):

$$\text{GI \%} = \left(\frac{M_i - M_s}{M_s} \right) * 100 \quad (\text{Equação 10})$$

Em que: M_i é a massa do suporte intumescida e M_s é a massa do suporte seco.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente foram realizados testes para a síntese dos 4 diferentes tipos de suportes poliméricos magnetizados com magnetita modificada com ácido oléico: (CP₁) copolímero magnetizado de estireno e dimetacrilato de etilenoglicol (STY-EGDMA-M), (CP₂) copolímero magnetizado de estireno e dimetacrilato de trietilenoglicol (STY-TEGDMA-M), (CP₃) copolímero magnetizado de estireno e triacrilato de trimetilpropano (STY- TMPTA-M) e (CP₄) copolímero magnetizado de estireno e divinilbenzeno (STY-DVB-M) (Figura 10). Estas polimerizações iniciais foram baseadas em trabalhos anteriores desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (BENTO, 2015; BENTO et al., 2017; SILVA, 2017; SILVA et al., 2018b), de acordo com a Tabela 10.

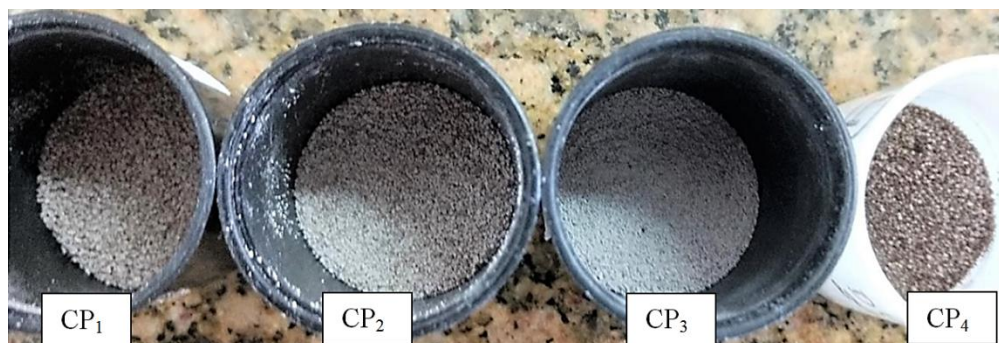
A Tabela 11 apresenta os rendimentos totais de polimerização (η_{total}) obtidos para os diferentes copolímeros sintetizados.

Tabela 10: Condições experimentais utilizadas para os testes das diferentes polimerizações.

Condições experimentais	
Volume reacional	~ 500 mL
Tempo total	360 min
Tempo sob atmosfera inerte	120 min
Agitação	310 rpm
Altura da haste	25 cm
Reticulante/Monômero base	50/50 (%)
Solvente/Não solvente	50/50 (%)
Iniciador (AIBN)	1 % sobre a massa dos monômeros
Fase aquosa (água UP)	400 mL
Agente de suspensão (PVA)	1 % da fase aquosa

Fonte: (SILVA, 2017).

Figura 10: Copolímeros magnetizados à base de estireno: (CP₁) STY-EGDMA-M, (CP₂) STY-TEGDMA-M, (CP₃) STY-TMPTA-M e (CP₄) STY-DVB-M.



Fonte: Próprio Autor

Tabela 11: Rendimentos totais obtidos para os diferentes copolímeros magnéticos sintetizados.

Copolímero	η_{total} (%)
STY-EGDMA-M	65,80
STY-TEGDMA-M	55,10
STY-TMPTA-M	80,30
STY-DVB-M	78,45

Fonte: Próprio autor.

Como observado na Tabela 11, nota-se que em todas as combinações testadas de monômero e reticulante ocorreu a formação de partículas poliméricas, obtendo-se rendimentos que variaram na faixa de 55 a 80 %. Dessa forma, dando continuidade ao trabalho e com o intuito de elevar o rendimento das polymerizações e obter partículas com tamanho entre 80 a 24 mesh (η_{PU}), consideradas adequadas para a imobilização de enzimas, foi realizada uma série de ensaios utilizando a ferramenta do planejamento experimental (Método de Taguchi), sendo empregado um arranjo ortogonal completo – L9.

Essa faixa granulométrica foi selecionada baseada em estudo realizado por Bento (2015), que verificou que o tamanho das partículas de STY-DVB-M nas faixas: 34-24, 42-35 e 80-42 mesh, não influenciava o rendimento de imobilização da lipase de *Candida rugosa* e tão pouco nos valores das atividades hidrolíticas obtidos.

5.1 EMPREGO DA METODOLOGIA DE PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DE ARRANJO ORTOGONAL COMPLETO (L9 -TAGUCHI)

Visando verificar e analisar a influência de alguns fatores na polimerização em suspensão dos diferentes copolímeros magnetizados sintetizados (STY-DVB-M, STY-EGDMA-M, STY-TEGDMA-M e STY-TMPTA-M), foram realizados planejamentos experimentais de arranjo ortogonal completo (L9 – Taguchi). Os fatores analisados foram: (A) % de massa dos monômeros (STY+ Reticulante) na mistura monômero/ solvente (m/m); (B) % de reticulante na massa total de monômeros (STY+ Reticulante) (m/m); (C) % de solvente com elevada afinidade/ solvente com baixa afinidade na mistura (massa toluol/ massa heptano) e (D) % de magnetita em relação à massa total de monômeros (STY+ Reticulante) (m/m). Foram estabelecidas duas variáveis respostas: rendimento total de polimerização (η_{total} %), que é a razão entre a massa de polímero total sintetizado (descontando-se a massa média de magnetita inserida) sobre a massa total de monômeros utilizada, e o rendimento das partículas úteis (η_{PU} %), definida como a razão entre a massa de partículas poliméricas sintetizadas classificadas entre de 80-24 mesh em relação à massa total de monômeros utilizada.

5.1.1 Influência dos fatores A, B, C e D no rendimento total de polimerização dos copolímeros magnetizados

Os resultados de rendimento de polimerização obtidos a partir dos arranjos ortogonais empregando os diferentes reticulantes estão apresentados na Tabela 12.

Em todos os ensaios realizados houve formação de partículas poliméricas magnetizadas, apresentando rendimentos na faixa de 38 a 89 %, dependendo das condições empregadas. A partir desses dados foram realizadas as análises de variância (ANOVA), apresentadas na Tabela 13. As análises foram realizadas com 95% de confiança, sendo o $F_{crítico}$ tabelado apresentando valor igual a 19.

Tabela 12: Rendimentos de polimerização total obtidos para os copolímeros em cada ensaio do planejamento experimental dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).

Ensaio	Nível codificado				Nível decodificado (%)				η total (%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	STY-DVB-M	STY-EGDMA-M	STY-TEGDMA-M	STY-TMPTA-M
1	1	1	1	1	30	30	40	10	58,80	40,15	38,22	54,92
2	1	2	2	2	30	45	50	15	70,99	58,14	49,37	73,56
3	1	3	3	3	30	60	60	20	78,10	88,72	53,83	84,37
4	2	1	2	3	40	30	50	20	75,55	56,56	54,32	79,61
5	2	2	3	1	40	45	60	10	83,41	64,42	49,22	83,58
6	2	3	1	2	40	60	40	15	82,76	74,79	50,84	82,09
7	3	1	3	2	50	30	60	15	83,05	59,79	55,84	80,41
8	3	2	1	3	50	45	40	20	84,55	74,54	50,86	83,99
9	3	3	2	1	50	60	50	10	85,50	87,15	51,31	86,10

Fonte: Próprio autor.

Tabela 13: Análises de variância (ANOVA) para os rendimentos de polimerização total (η_{total}) obtidos para os copolímeros a partir dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).

ANOVA dos Fatores					
Fonte de variação		SQ	GL	SMQ	F
STY-DVB-M	A	368,66	2	184,33	17,05
	B	150,89	2	75,44	6,98
	C	59,15	2	29,57	2,74
	D	21,63	-	-	-
	Erro = SQD	21,63	2	10,81	-
	SQT	600,32			
STY-EGDMA-M	A	213,99	2	107,00	2,33
	B	1487,02	2	743,51	16,21
	C	91,74	-	-	-
	D	169,45	2	84,72	1,85
	Erro = SQC	91,74	2	45,87	-
	SQT	1962,20			
STY-TEGDMA-M	A	50,71	2	25,35	4,49
	B	11,28	-	-	-
	C	66,93	2	33,47	5,93
	D	79,84	2	39,92	7,08
	Erro = SQB	11,28	2	5,64	-
	SQT	208,76			
STY-TMPTA-M	A	277,39	2	138,69	3,05
	B	247,98	2	123,99	2,72
	C	129,44	2	64,72	1,42
	D	91,04	-	-	-
	Erro = SQD	91,04	2	45,52	-
	SQT	745,85			

Fonte: Próprio autor.

Como não existem graus de liberdade disponíveis para calcular o Erro, e observando que o fator D é irrelevante para os resultados obtidos para o STY-DVB-M (Tabela 13), visto que apresenta o menor valor de SQ (soma quadrática dos efeitos), este foi adotado como erro e utilizado para a análise da ANOVA. Os valores de F obtidos para os fatores são menores que o $F_{\text{crítico}}$, demonstrando que não são significativos para o processo, na faixa estudada. No entanto, os valores de F para os fatores A, B e C são maiores que 2, considerados relevantes ao processo de polimerização. Destaque especial deve ser dado ao fator A (17,05), **evidenciando uma maior influência da proporção entre os solventes na obtenção dessas partículas poliméricas.**

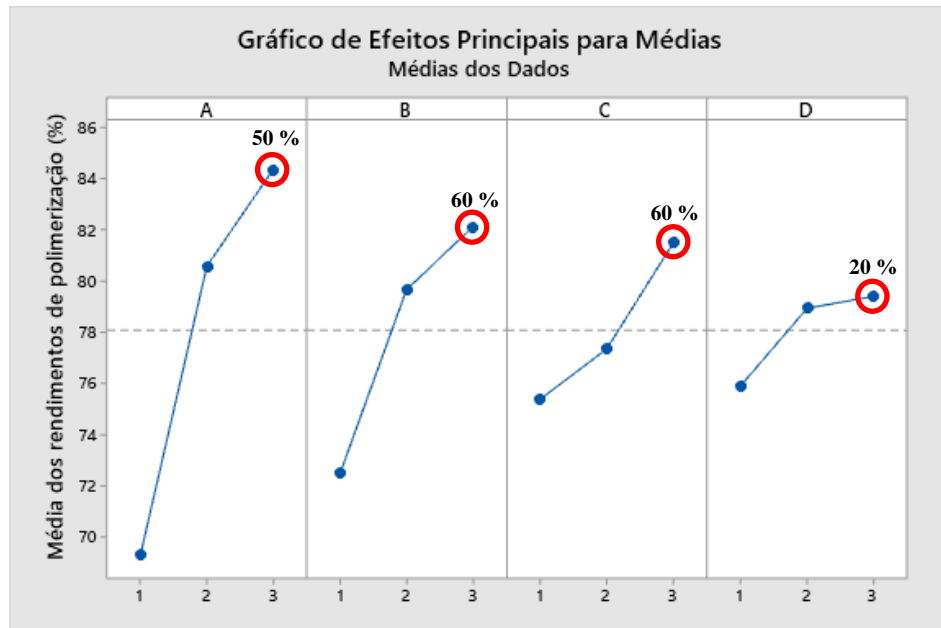
Para o STY-EGDMA-M (Tabela 13), foi utilizado o fator C como Erro, para a análise da ANOVA. Os valores de F para os fatores A, B e D são menores que o $F_{\text{crítico}}$ (19), e portanto não significativos, porém maiores que 2, sendo analisados para a síntese desse copolímero. O fator B merece especial atenção, pois seu valor de F (16,21) é próximo ao $F_{\text{crítico}}$, e a razão monômero/ reticulante é de grande importância, já que o grau de reticulação tem influência direta na porosidade do suporte, fator determinante para a imobilização de enzimas (ANGELICA; NEVES; DIAS, 1997).

O fator B foi utilizado como Erro para a análise ANOVA da síntese do STY-TEGDMA-M. Os fatores A, C e D, apresentaram valores de F superior a 2, e portanto exercem influência relevante no rendimento de polimerização, embora estatisticamente, não sejam considerados significativos. Nesse caso, destaca-se a proporção de magnetita sobre a massa total de monômero (fator D), devido seu valor de F (7,08). Entende-se que a adição da magnetita no início da síntese influencia diretamente no rendimento total de polimerização, visto que, quanto mais óxido de ferro for adicionado, mais Fe será inserido na matriz, aumentando a massa final obtida das partículas poliméricas.

Para a síntese do STY-TMPTA-M (Tabela 13), o fator D apresentou o menor valor de SQ (soma quadrática dos efeitos), sendo portanto, usado como erro para a análise da ANOVA. Nesse estudo os fatores A e B apresentaram valores de F pouco superiores a 2, demonstrando uma mínima interferência sobre a síntese das partículas magnetizadas.

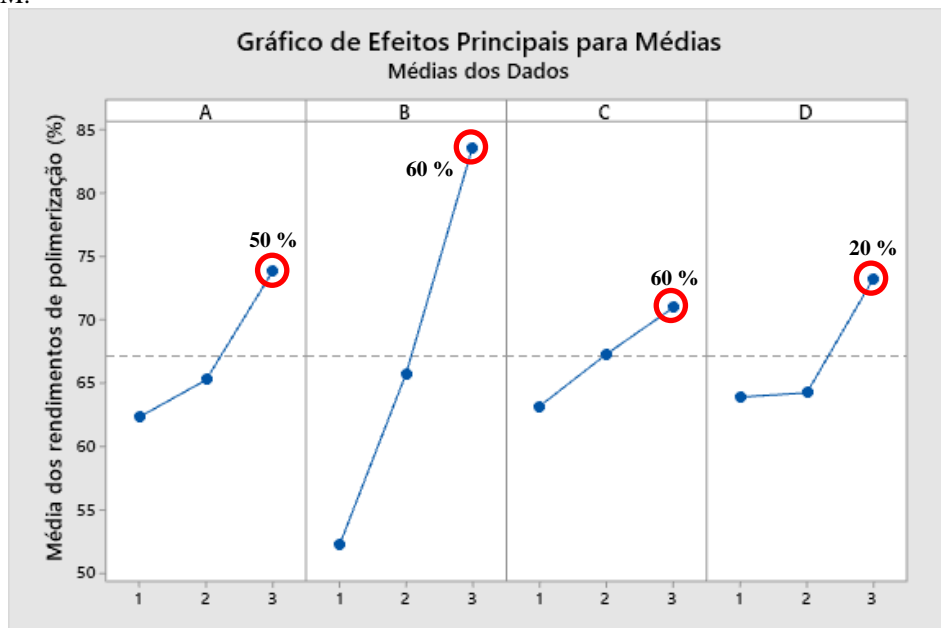
As Figuras de 11 a 14 apresentam os gráficos dos efeitos principais sobre a média da variável resposta. Cada fator foi analisado separadamente para avaliar o efeito que cada um deles exerceu sobre o rendimento de polimerização total.

Figura 11: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-DVB-M.



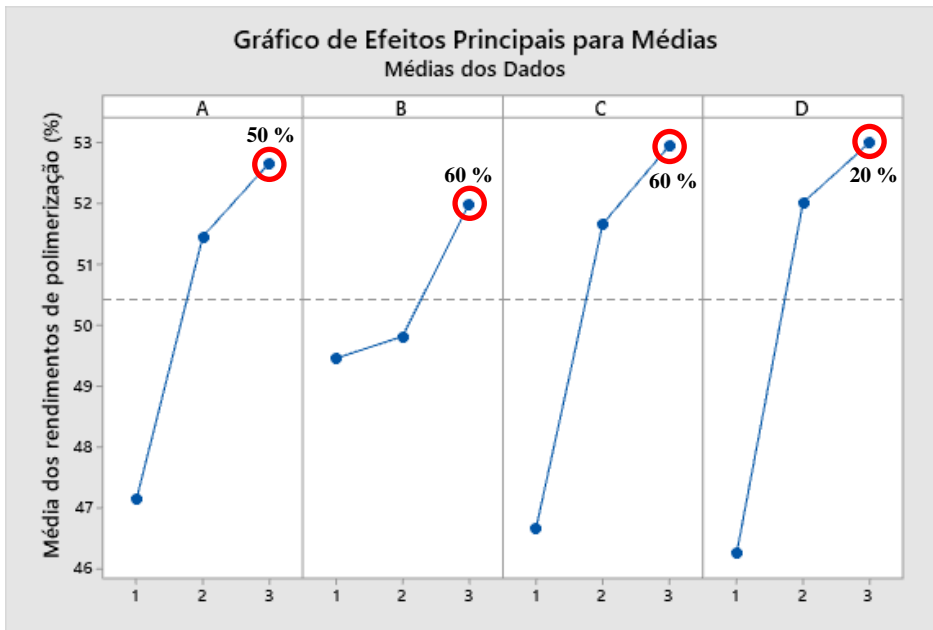
Fonte: Próprio autor.

Figura 12: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-EGDMA-M.



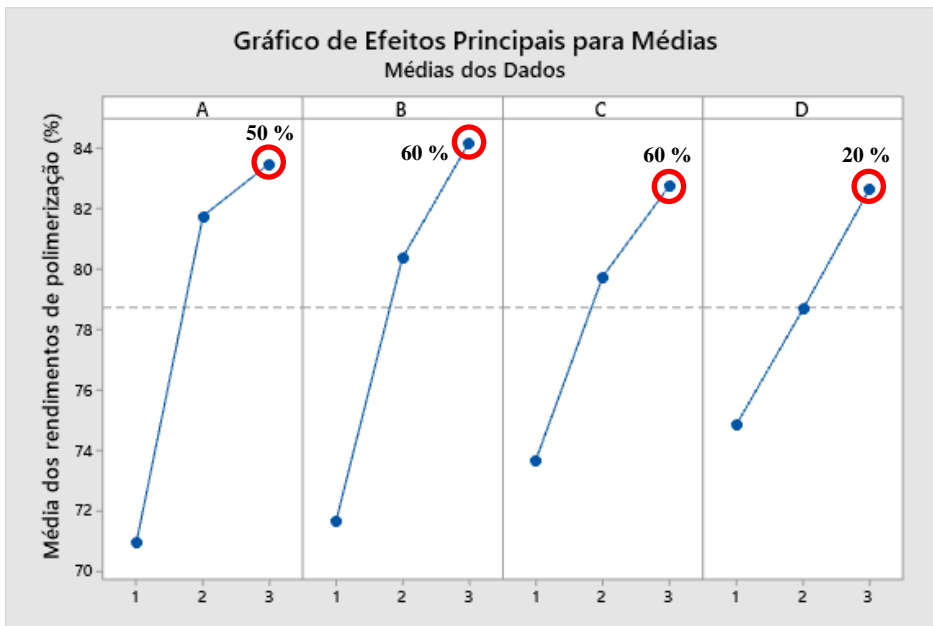
Fonte: Próprio autor.

Figura 13: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-TEGDMA-M.



Fonte: Próprio autor.

Figura 14: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao η_{total} (%) para o STY-TMPTA-M.



Fonte: Próprio autor.

Analisando os gráficos dos efeitos é possível determinar a condição de melhor ajuste para o processo de polimerização, visando o rendimento total das partículas, que seria, para todos os copolímeros, no nível máximo para os 4 fatores estudados (3333).

A indicação no nível máximo para todos os fatores, pode ser explicada tomando por base o efeito que cada um dos fatores estudados pode causar no rendimento de polimerização.

O efeito da porcentagem da massa dos monômeros na mistura monômero/solvente (A) pode ser explicado em função da velocidade da reação, visto que, quanto maior a concentração de reagentes (nesse caso, de monômeros), maior a velocidade da reação, podendo resultar em uma maior quantidade de polímero sintetizado.

Para o fator que relaciona a porcentagem de reticulante na massa total de monômeros (B), o efeito pode ser explicado em função do grau de reticulação do polímero sintetizado, visto que, quanto maior a proporção de agente reticulante na polimerização, mais reticulado será o polímero, aumentando a proporção da fração gel do polímero e reduzindo as cadeias solúveis. Shim et al. (2004) obtiveram resultados similares variando a proporção de reticulante, durante a polimerização do estireno e divinilbenzeno. Empregando 10 % (mol/mol) de divinilbenzeno observaram rendimento de polimerização de aproximadamente 25 %. Esse rendimento foi aumentado gradativamente, conforme o aumento da proporção de reticulante, chegando a 63,5 % de rendimento com 75 % (mol/mol).

O fator (C) estuda a porcentagem de solvente com elevada afinidade/ solvente com baixa afinidade na mistura (massa toluol/ massa heptano), e como o heptano é o solvente com menor afinidade pelo meio reacional, quando está presente em grande quantidade, ele dificulta a solvatação das cadeias poliméricas. Assim, o nível máximo desse fator (maior proporção de toluol), acarreta um maior rendimento de polimerização.

O efeito do fator da porcentagem de magnetita em relação à massa total de monômeros (D), conforme dito anteriormente, pode ser explicado pela incorporação da magnetita ao copolímero durante a polimerização, portanto maiores proporções de magnetita, resultarão em mais massa de Fe_3O_4 inserida à matriz do copolímero, proporcionando um maior rendimento em massa das partículas, à menos que exista um ponto de saturação. Essa questão foi analisada e será apresentada no Item 5.2.4.

Visto que o ajuste indicado (3333), não faz parte da matriz experimental inicialmente proposta, julgou-se necessário a realização de novos experimentos para confirmação deste apontamento (Item 5.1.3).

5.1.2 Influência dos fatores A, B, C e D no rendimento das partículas úteis (80-24 mesh) dos copolímeros magnetizados

A Tabela 14 mostra os resultados de rendimento das partículas úteis na faixa de 80-24 mesh para os diferentes copolímeros estudados, de acordo com os arranjos ortogonais.

Em todos os ensaios realizados houve formação das partículas úteis, apresentando rendimentos que variaram de 15 a 85 %, dependendo das condições empregadas. A partir desses dados foram realizadas as análises de variância (ANOVA), apresentada na Tabela 15. As análises foram realizadas com 95% de confiança, sendo o $F_{\text{crítico}}$ tabelado apresentando valor igual a 19.

Para a síntese das partículas úteis dos copolímeros (Tabela 15), os valores de F dos fatores apresentaram-se menores que o $F_{\text{crítico}}$, mostrando que não são significativos para a faixa estudada, com exceção da síntese do copolímero STY-EGDMA-M, em que o fator A mostrou-se superior ao $F_{\text{crítico}}$. Para este copolímero o fator razão monômero/solvente apresentou valor de F igual a 47,28, demonstrando grande influência sobre o rendimento das partículas úteis, sendo observado que a menor proporção de monômero resultou em maior rendimento.

Vale ressaltar que os fatores que apresentaram os menores valores de SQ foram adotados como erro para análise da ANOVA dos seus respectivos planejamentos.

Tabela 14: Rendimentos de polimerização das partículas úteis (η_{PU}) obtidos para os copolímeros em cada ensaio do planejamento experimental dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).

Ensaio	Nível codificado				Nível decodificado (%)				η_{PU} (%)			
	A	B	C	D	A	B	C	D	STY-DVB-M	STY-EGDMA-M	STY-TEGDMA-M	STY-TMPTA-M
1	1	1	1	1	30	30	40	10	66,26	83,01	15,72	79,54
2	1	2	2	2	30	45	50	15	75,25	85,61	73,60	71,46
3	1	3	3	3	30	60	60	20	72,99	69,90	73,29	72,53
4	2	1	2	3	40	30	50	20	75,08	64,88	56,24	24,51
5	2	2	3	1	40	45	60	10	81,55	74,23	15,20	78,24
6	2	3	1	2	40	60	40	15	81,51	64,63	72,62	69,31
7	3	1	3	2	50	30	60	15	77,39	52,54	63,96	70,31
8	3	2	1	3	50	45	40	20	61,61	56,71	48,47	76,11
9	3	3	2	1	50	60	50	10	79,85	24,96	68,75	77,79

Fonte: Próprio autor.

Tabela 15: Análises de variância (ANOVA) para os rendimentos em partículas úteis (η_{PU}) obtidos para os copolímeros a partir dos arranjos ortogonais (L9 – Taguchi).

ANOVA dos Fatores					
Fonte de variação		SQ	GL	SMQ	F
STY-DVB-M	A	105,42	2	52,71	2,49
	B	55,32	-	-	-
	C	104,84	2	52,42	2,48
	D	107,17	2	53,58	2,53
	Erro = SQB	55,32	2	27,66	-
	SQT	372,75			
STY-EGDMA-M	A	2040,74	2	1020,37	47,28
	B	610,04	2	305,02	14,13
	C	195,58	2	97,79	4,53
	D	43,16	-	-	-
	Erro = SQD	43,16	2	21,58	-
	SQT	2889,53			
STY-TEGDMA-M	A	251,97	-	-	-
	B	1207,52	2	603,76	4,79
	C	949,66	2	474,83	3,77
	D	2493,43	2	1246,72	9,90
	Erro = SQA	251,97	2	125,99	-
	SQT	4902,59			
STY-TMPTA-M	A	596,54	2	298,27	1,13
	B	526,34	-	-	-
	C	541,80	2	270,90	1,03
	D	659,50	2	329,75	1,25
	Erro = SQB	526,34	2	263,17	-
	SQT	2324,18			

Fonte: Próprio autor.

As Figuras de 15 a 18 apresentam os gráficos dos efeitos principais sobre a média da variável resposta rendimento de partículas úteis (η_{PU} %), bem como a superfície de contorno para todos os copolímeros sintetizados, indicando a tendência de maximização do rendimento.

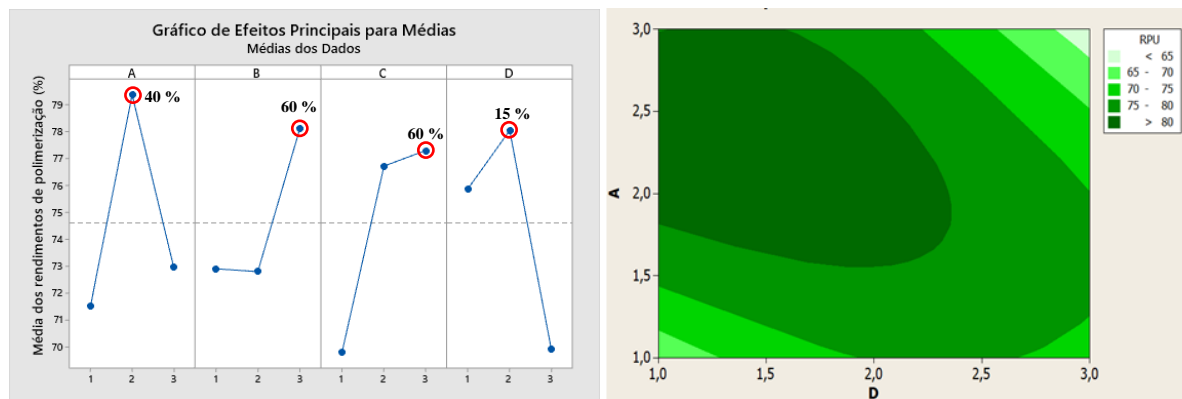
Analisando-se a Figura 15 observa-se que a condição de melhor ajuste para a síntese das partículas úteis do STY-DVB-M é a (2332), em que os fatores A e D seriam ajustados no nível nominal e os fatores B e C no nível máximo.

A condição mais adequada para maximizar o rendimento das partículas na faixa 80-24 mesh de STY-EGDMA-M é a (1212), na qual os fatores A, B e D devem ser ajustados no nível mínimo (1) e o fator C no nível nominal (2) (Figura 16).

Para a obtenção do melhor rendimento das partículas úteis do STY-TEGDMA-M (Figura 17) a condição ideal, de acordo com o gráfico de efeitos, é a (3322), em que os fatores A e B devem ser ajustados no nível máximo (3) e os fatores C e D no nível nominal (2).

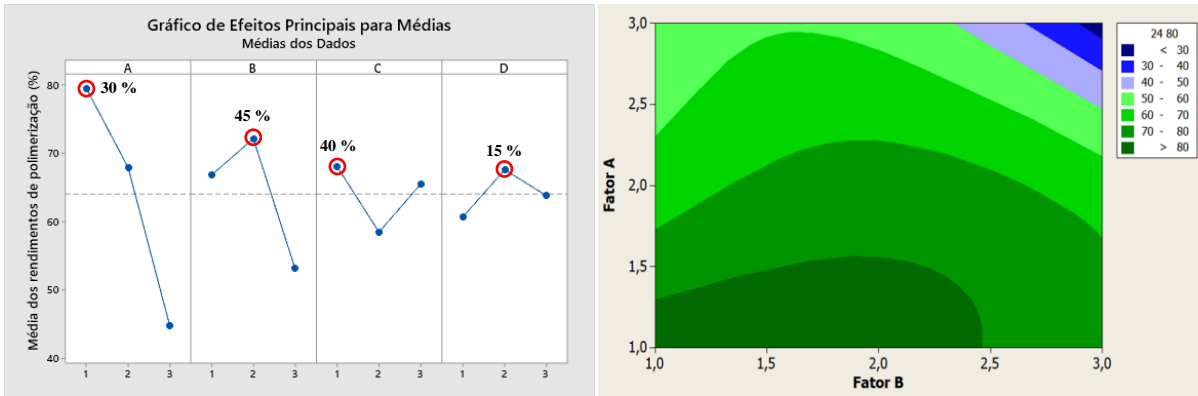
De acordo com a Figura 18, a condição que proporciona a obtenção do maior rendimento das partículas de STY-TMPTA-M na faixa de tamanho selecionada é a (3231), na qual os fatores A e C devem ser ajustados no nível máximo (3), o fator B no nível nominal (2) e o fator D no nível mínimo (1).

Figura 15: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-DVB-M e representação da superfície de contorno.



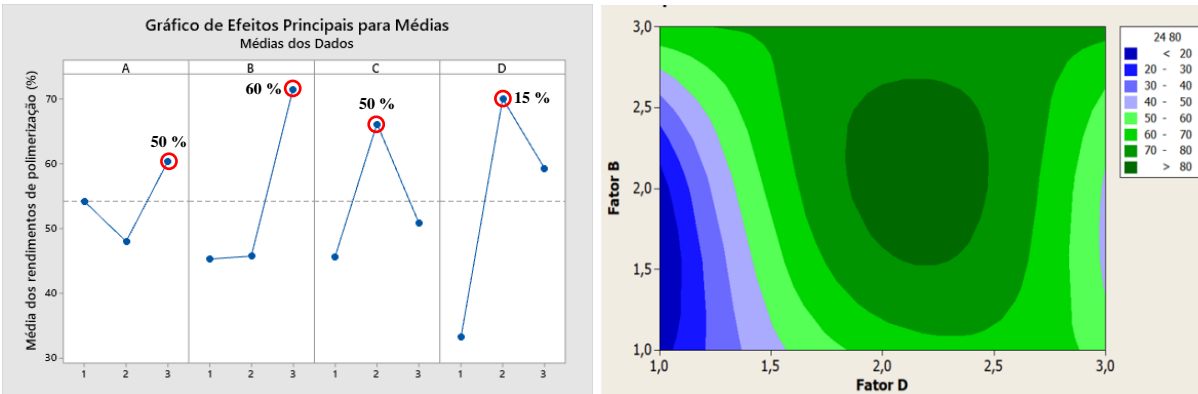
Fonte: Próprio autor.

Figura 16: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-EGDMA-M e representação da superfície de contorno.



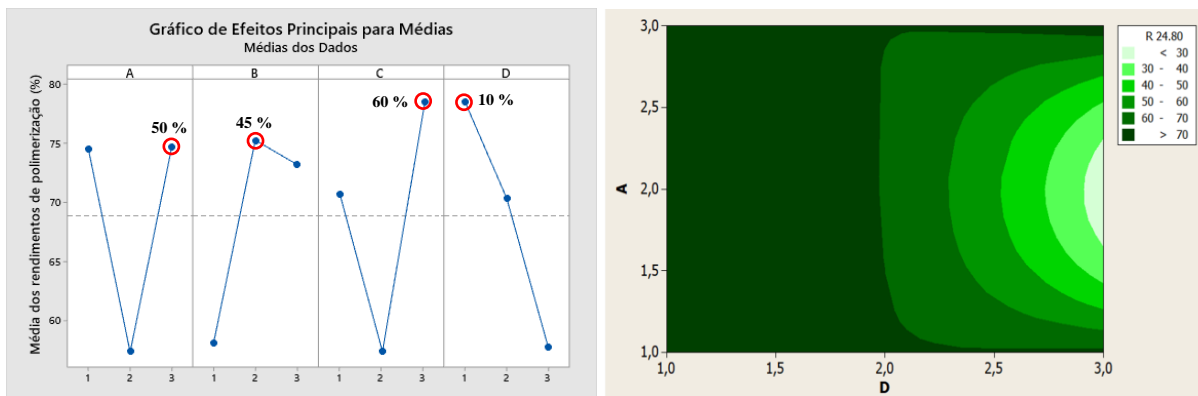
Fonte: Próprio autor.

Figura 17: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-TEGDMA-M e representação da superfície de contorno.



Fonte: Próprio autor.

Figura 18: Gráfico dos efeitos principais sobre as médias dos fatores em relação ao rendimento em partículas úteis (η_{PU}) para o STY-TMPTA-M e representação da superfície de contorno.



Fonte: Próprio autor.

Diferentemente do que foi observado para o rendimento total de partículas, na qual todos os copolímeros apresentaram a mesma condição experimental ideal (3333), para o

rendimento em partículas úteis, estas condições foram distintas para cada tipo de copolímero. Esse fato pode estar relacionado à interação do PVA (agente de suspensão utilizado) com as diferentes composições das gotas durante as polimerizações, o que influencia a coagulação das partículas durante a síntese.

Para um melhor entendimento de como a interação desses fatores interfere no tamanho das partículas, seria necessária uma análise mais detalhada, como por exemplo realizar um estudo da distribuição do tamanho de partículas (não investigado no presente trabalho).

Similarmente ao rendimento total de polimerização, também foram realizados novos ensaios para a confirmação da indicação estatística para o rendimento das partículas úteis (80-24 mesh) dos diferentes copolímeros.

5.1.3 Experimentos de confirmação das indicações das melhores condições de síntese dos copolímeros, de acordo com a metodologia experimental (Taguchi – L9)

Visando confirmar as condições ideais apontadas pela análise estatística, novos ensaios foram realizados, tanto para maximização do rendimento total de polimerização (η_{total}) como para a máxima obtenção das partículas úteis (η_{Pu}), sendo os resultados obtidos apresentados na Tabela 16 e 17, respectivamente.

Tabela 16: Confirmação da indicação do método estatístico para variável resposta rendimento total (η_{total}) e comparativo com os melhores resultados obtidos na matriz experimental inicialmente proposta (Taguchi – L9).

Suporte	Condição experimental da Matriz Taguchi				Melhor η_{total} (%) da Matriz Taguchi	Condição experimental indicada				η_{total} (%) obtido na confirmação
	A	B	C	D		A	B	C	D	
STY-DVB-M	3	2	1	3	84,55	3	3	3	3	87,27
STY-EGDMA-M	1	3	3	3	88,72	3	3	3	3	86,15
STY-TEGDMA-M	2	1	2	3	54,32	3	3	3	3	66,35
STY-TMPTA-M	1	3	3	3	84,37	3	3	3	3	87,65

Fonte: Próprio autor.

Analisando a Tabela 16, observa-se que os ensaios realizados na condição experimental indicada pela análise estatística, de forma geral, foram superiores aos obtidos pela matriz inicialmente proposta, comprovando o apontamento do Método de Taguchi. Nota-se que apenas o copolímero de STY-EGDMA-M apresentou uma leve queda no rendimento total de polimerização, considerada irrelevante, visto que esses valores são próximos a 90 %.

Tabela 17: Confirmação da indicação do método estatístico para variável resposta rendimento de partículas úteis (η_{PU}) e comparativo com os melhores resultados obtidos na matriz experimental inicialmente proposta (Taguchi – L9).

Suporte	Condição experimental da Matriz Taguchi				Melhor η_{PU} (%) da Matriz Taguchi	Condição experimental indicada				η_{PU} (%) obtido na confirmação
	A	B	C	D		A	B	C	D	
STY-DVB-M	2	2	3	1	81,55	2	3	3	2	75,34
STY-EGDMA-M	1	1	1	1	88,01	1	2	1	2	85,41
STY-TEGDMA-M	1	2	2	2	83,60	3	3	2	2	73,02
STY-TMPTA-M	1	1	1	1	79,54	3	2	3	1	85,10

Fonte: Próprio autor.

Por outro lado, os resultados obtidos para a confirmação das condições experimentais indicadas pela análise estatística para maximizar o rendimento das partículas úteis dos copolímeros (Tabela 17), mostraram-se inferiores aos obtidos pela matriz L9 inicialmente proposta, exceto para o STY-TMPTA-M. Estas constatações, provavelmente estão relacionadas à outros fatores que podem influenciar o rendimento dessas partículas úteis, como por exemplo a agitação empregada durante a polimerização (fator não analisado no presente trabalho).

Dessa forma, para dar continuidade ao trabalho, foram selecionadas as condições experimentais nas quais obtiveram-se os maiores rendimentos de partículas úteis, independentemente se obtidas a partir da matriz L9 ou da confirmação da indicação estatística (Tabela 18).

Tabela 18: Condições experimentais selecionadas para a obtenção dos melhores rendimentos em partículas úteis (80-24 mesh) para os diferentes copolímeros magnéticos sintetizados.

Suporte	Condição experimental selecionada	η_{PU} (%)
STY-DVB-M	(2231)	81,55
STY-EGDMA-M	(1111)	88,01
STY-TEGDMA-M	(1222)	83,60
STY-TMPTA-M	(3231)	85,10

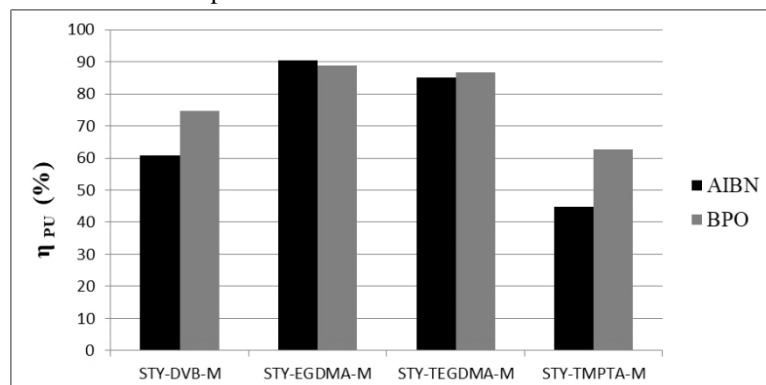
Fonte: Próprio autor

5.1.4 Influência do tipo de agente iniciador no rendimento das partículas úteis dos copolímeros magnéticos

Com o intuito de verificar o comportamento de um outro agente iniciador, o peróxido de benzoíla (BPO), no rendimento das partículas úteis dos copolímeros em estudo no presente trabalho, foram realizados novos testes. Os resultados encontrados foram comparados com aqueles obtidos quando se empregou o iniciador azobis(isobutironitrila) (AIBN) e são apresentados na Figura 19.

Destaca-se que as condições experimentais utilizadas para cada copolímero, foram as estabelecidas na Tabela 18, no entanto, o fator D (% de magnetita em relação à massa total de monômeros) foi ajustado para o nível máximo. Dessa forma, os copolímeros foram sintetizados empregando 20 % de magnetita, visando a obtenção de uma maior inserção do óxido de ferro ao suporte. Detalhes adicionais deste estudo são apresentados no Item 5.2.4.

Figura 19: Comparação dos rendimentos em partículas úteis obtidos empregando-se AIBN e BPO como agente iniciador, para a síntese dos diferentes copolímeros.



Fonte: Próprio autor

O AIBN, amplamente utilizado como agente iniciador, é um material auto-reativo típico. Por ser um composto azo, apresenta uma decomposição acelerada. Essa característica faz com que sejam gerados muitos radicais livres durante a polimerização, resultando em cadeias poliméricas menores. O BPO é um forte agente oxidante altamente instável e inflamável, também muito utilizado como iniciador em sínteses poliméricas. Materiais obtidos a partir desse iniciador apresentam cadeias poliméricas maiores, pois se decompõe de forma mais lenta (AGUIAR et al., 2014; LI; WANG; KOSEKI, 2008; WANG et al., 2017).

Embora os agentes iniciadores apresentem diferentes características, estas não influenciaram o rendimento de polimerização em partículas úteis, visto que, de modo geral, os resultados obtidos foram semelhantes para cada copolímero, independentemente do iniciador empregado na síntese (Figura 19). No entanto, diferenças mais acentuadas podem ser observadas em outros aspectos das matrizes poliméricas, como morfologia, porosidade etc. A discussão sobre esses parâmetros será apresentada nos Itens 5.2.11, 5.2.13 e 5.2.14.

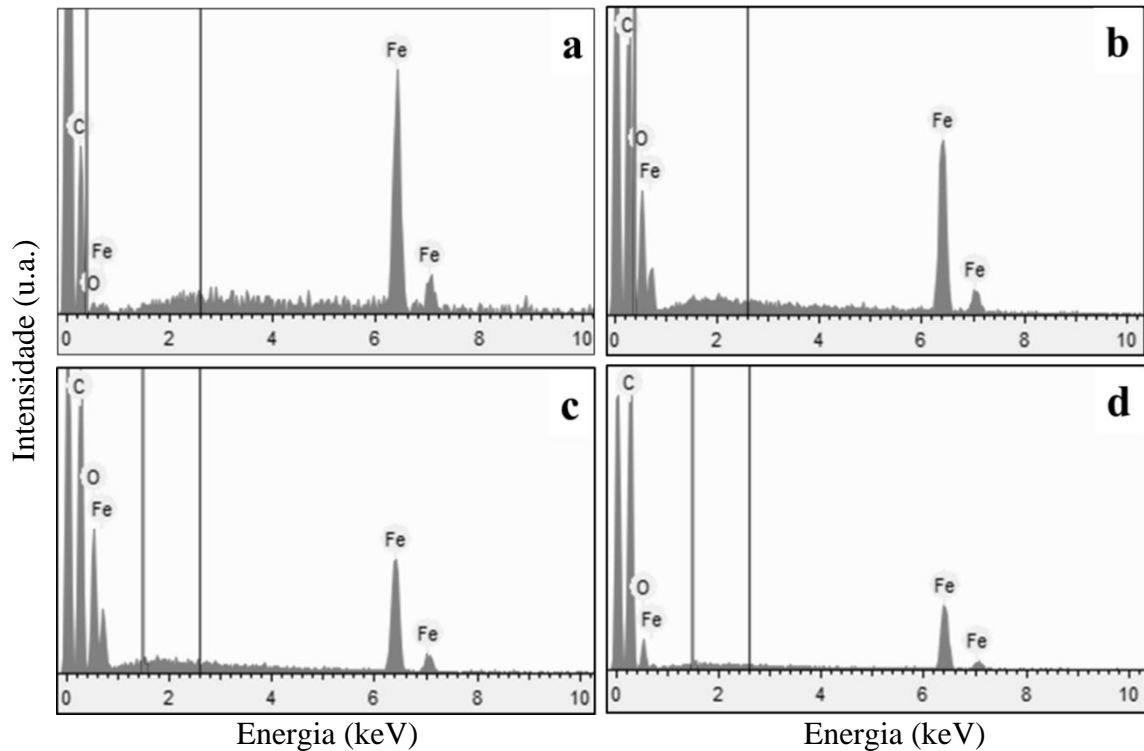
5.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COPOLÍMEROS MAGNETIZADOS SINTETIZADOS

Com o intuito de estabelecer critérios comparativos, para as análises de caracterização dos copolímeros, foram selecionadas as partículas úteis obtidas nos experimentos de confirmação para maximização do rendimento total, ou seja, sintetizadas no nível máximo para todos os fatores analisados. Entretanto, para as análises de MEV, MOC, BET e Grau de Intumescimento, foram empregados os copolímeros obtidos nas melhores condições de rendimento em partículas úteis, empregando os dois agentes iniciadores avaliados no presente trabalho.

5.2.1 Espectroscopia por Energia Dispersiva de Raios-X (EDX)

A partir das análises obtidas pela técnica de espectroscopia por energia dispersiva de raios-X, foi possível obter os espectros das composições dos copolímeros sintetizados (Fig. 20), comprovando a incorporação da magnetita nas matrizes sintetizadas.

Figura 20: Espectros obtidos pela análise de EDX dos copolímeros de STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.



Fonte: Próprio autor.

Nota-se que o pico principal referente ao ferro no STY-DVB-M (Fig. 20a) é mais intenso que nos demais copolímeros. Esta observação é devida à baixa quantidade de oxigênio presente na matriz polimérica (proveniente da magnetita e/ou presença de umidade), já que os monômeros que constituem esse suporte (estireno: C_8H_8 e divinilbenzeno: $C_{10}H_{10}$), não possuem oxigênio em sua composição.

Os demais espectros apresentados na Figura 20, são compostos por carbono (C), hidrogênio (H) oxigênio (O) e ferro (Fe), visto que os demais reticulantes utilizados para a síntese dos copolímeros apresentam oxigênio em sua composição (EGDMA: $C_{10}H_{14}O_4$, TEGDMA: $C_{14}H_{22}O_6$ e TMPTA: $C_{15}H_{20}O_6$). Vale destacar, que esta técnica não detecta o hidrogênio presente na matriz polimérica.

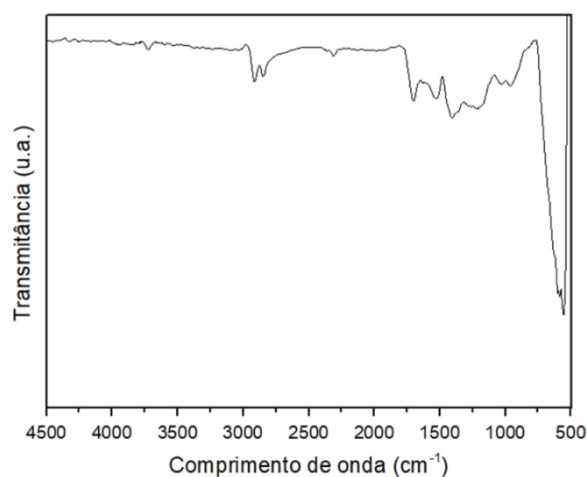
Como os copolímeros de STY- EGDMA-M, STY-TEGDMA-M e STY-TMPTA-M possuem maiores teores de oxigênio em suas composições, a distribuição das porcentagens atômicas dos elementos, gera a impressão de que a quantidade de magnetita incorporada foi reduzida, enquanto que, na realidade o que ocorreu foi uma normatização desses teores.

5.2.2 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

As análises de Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR), técnica que auxilia a caracterização dos grupos funcionais presentes na superfície de um material através da vibração das moléculas, também proporcionaram a constatação da inserção da magnetita aos copolímeros sintetizados, bem como a identificação da presença dos diferentes agentes reticulantes testados.

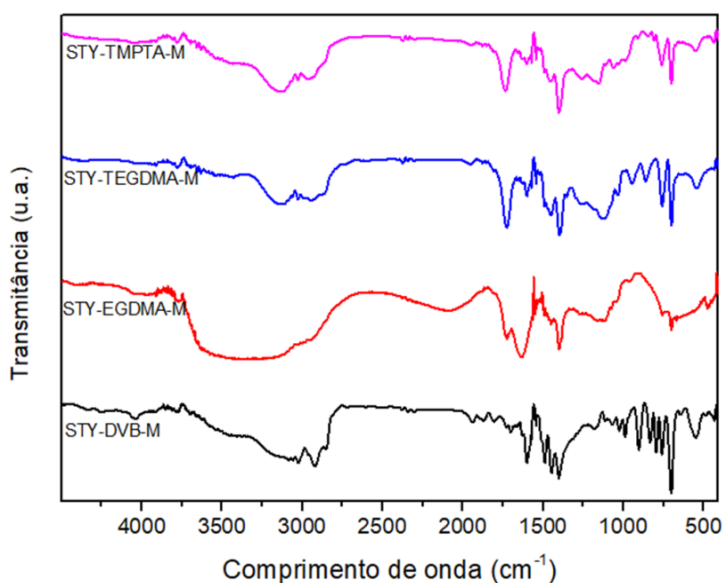
Os espectros de FT-IR da magnetita sintetizada e dos copolímeros magnetizados são apresentados nas Figuras 21 e 22, respectivamente.

Figura 21: Espectro de FT-IR da magnetita pura.



Fonte: Próprio autor.

Figura 22: Espectros de FT-IR dos diferentes copolímeros magnetizados: STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.



Fonte: Próprio autor.

O espectro da magnetita pura (Fig. 21) apresenta um pico característico com comprimento de onda à $\approx 570 \text{ cm}^{-1}$, referente a ligação Fe-O, levemente deslocado à direita (GAUTAM et al., 2015). Como dito anteriormente, a magnetita é tratada com ácido oleico, o que justifica a presença de picos de baixa intensidade em C=O ($\nu 1700 \text{ cm}^{-1}$) e C-O ($\nu 1212 \text{ cm}^{-1}$), além de bandas de estiramento de CH_2 ($\delta 2846 \text{ cm}^{-1}$ e $\nu 2912 \text{ cm}^{-1}$), indicando traços residuais do ácido.

No espectro referente ao copolímero de STY-DVB-M (Fig. 22 - preto), pode ser observada a presença da magnetita, justificada pela banda característica da ligação Fe-O ($\approx 550 \text{ cm}^{-1}$). As bandas do estireno (STY) podem ser observadas em $\approx 1446 \text{ cm}^{-1}$ (dobramento -C-H), 759 cm^{-1} (=C-H dobramento) e 697 cm^{-1} (dobramento -C-H aromático) (PANIGRAHI; SRIVASTAVA, 2015). As bandas entre $1940 - 1700 \text{ cm}^{-1}$ e $1600 - 1400 \text{ cm}^{-1}$ são referentes às ligações substituídas dos anéis aromáticos do divinilbenzeno (DVB).

A banda característica da magnetita (ligação Fe-O) no espectro do copolímero STY-EGDMA-M (Fig. 22 - vermelho) apresenta-se um pouco deslocada (em 490 cm^{-1}). Nota-se também as bandas do STY em $\approx 1458 \text{ cm}^{-1}$ (dobramento -C-H), 759 cm^{-1} (=C-H dobramento) e 697 cm^{-1} (dobramento -C-H aromático), além da banda de estiramento de C-H ($\nu 2943 \text{ cm}^{-1}$) (PANIGRAHI; SRIVASTAVA, 2015; PREMARATNE et al., 2014). As bandas 1720 cm^{-1} (C=O), 1640 cm^{-1} (C=C), 1275 cm^{-1} (C-O-C) e 1155 cm^{-1} (C=O) são referentes ao reticulante empregado (ZHU et al., 2015).

O espectro do copolímero de STY-TEGDMA-M, apresentado na Figura 22 (azul), possui muita semelhança com o espectro obtido do copolímero de STY-EGDMA-M, como a presença da banda da magnetita em 540 cm^{-1} ; das bandas características do STY em $\approx 1457 \text{ cm}^{-1}$ (dobramento -C-H), 753 cm^{-1} (=C-H dobramento) e 697 cm^{-1} (dobramento -C-H aromático) (PANIGRAHI; SRIVASTAVA, 2015; SMITH, 1979), além da banda de estiramento de C-H ($\nu 2943 \text{ cm}^{-1}$ e 1400 cm^{-1}) (PREMARATNE et al., 2014). As bandas 1727 cm^{-1} (C=O), 1613 cm^{-1} (C=C), 1259 cm^{-1} (C-O-C) e 1135 cm^{-1} (C=O) são referentes ao reticulante empregado (ZHU et al., 2015).

A Figura 22 (magenta) mostra o espectro do copolímero de STY-TMPTA-M, e assim como os demais copolímeros analisados, apresenta bandas características da magnetita (ligação Fe-O) em 550 cm^{-1} ; bandas características do STY em $\approx 1457 \text{ cm}^{-1}$ (dobramento -C-H), 759 cm^{-1} (=C-H dobramento), 697 cm^{-1} (dobramento -C-H aromático)

e a banda de estiramento de C-H (ν 2964 cm^{-1} , 1457 cm^{-1} e 1393 cm^{-1}) (PANIGRAHI; SRIVASTAVA, 2015; SMITH, 1979).

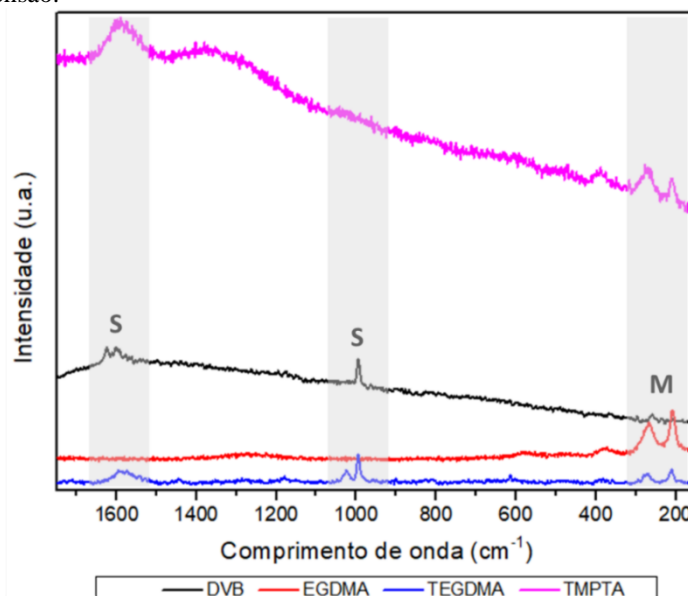
Em função dos agentes reticulantes EGDMA, TEGDMA e TMPTA apresentarem os mesmo grupamentos químicos em sua composição, os espectros gerados a partir de seus copolímeros são bastante semelhantes, mostrando bandas em 1737 cm^{-1} (C=O), 1602 cm^{-1} (C=C), 1262 cm^{-1} (C-O-C) e 1145 cm^{-1} (C=O) (ZHU et al., 2015).

O alargamento das bandas em $\approx 3700 - 2700 \text{ cm}^{-1}$ (estiramento O-H), observado em todos os espectros, pode ser atribuído à presença de umidade nos copolímeros e no sal de KBr utilizado para confeccionar a pastilha, técnica empregada para preparação das amostras.

5.2.3 Espectroscopia Raman

As amostras poliméricas foram analisadas por espectroscopia Raman, de forma a complementar as análises de FT-IR, visto que tratam-se de técnicas correlacionadas e esses espectros podem ser vistos na Figura 23.

Figura 23: Espectros obtidos por Raman para os copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.



Fonte: Próprio autor

Em ambas as análises é possível perceber bandas características dos constituintes dos materiais em estudo (Fig. 23), principalmente do monômero base (estireno), identificado como S no espectro, (≈ 1000 , $\approx 1600 \text{ cm}^{-1}$) (SEARS; HUNT; STEVENS, 1981), e da banda

características da magnetita (M) ($\approx 250 \text{ cm}^{-1}$) (SHEBANOVA; LAZOR, 2003), reafirmando a inserção da magnetita às matrizes poliméricas.

5.2.4 Espectrometria de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-OES)

Para a determinação mais precisa da porcentagem de Fe presente em cada tipo de copolímero, foi utilizada a técnica de espectrometria de emissão atômica por plasma acoplado indutivamente (Tabela 19).

As amostras dos copolímeros foram digeridas empregando duas metodologias (água régia e água régia + HF), conforme descritas no Item 4.5.4, a fim de solubilizá-las para possibilitar a análise no ICP-OES.

Tabela 19: Teor de Fe obtido pela análise de ICP-OES para os copolímeros sintetizados, empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.

Copolímero	Digestão	% m/m (Fe)
STY-DVB-M	Água-régia	6,838
	Água-régia + HF	5,612
STY-EGDMA-M	Água-régia	5,355
	Água-régia + HF	4,597
STY-TEGDMA-M	Água-régia	8,145
	Água-régia + HF	7,206
STY-TMPTA-M	Água-régia	5,737
	Água-régia + HF	5,100

Fonte: Próprio autor.

De acordo com os dados apresentados na Tabela 19, observa-se uma pequena diferença no percentual de íons de Fe obtido entre os dois métodos de digestão testados. Embora não significativa, este fato deve estar associado à quantidade de massa polimérica presente na solução, visto que, a digestão utilizando a água régia, ataca somente a superfície

do polímero, enquanto que, o emprego de água régia+HF gera a decomposição total da amostra. Dessa forma, os íons de ferro estarão mais diluídos na solução resultante do segundo método (água régia+HF), apresentando menor porcentagem de ferro.

Vale ressaltar que em todas as formulações dos copolímeros analisados, foi empregado 20% de magnetita em relação à massa total de monômero (condição 3333), constatando que grande parte da magnetita não está sendo inserida à matriz magnetizada, visto que a porcentagem de Fe presente nos copolímeros é, em média, de apenas 6 % (m/m).

Dessa forma, julgou-se necessário avaliar se a magnetita adicionada no momento da polimerização, não estava em uma quantidade excessiva para total solubilização na fase orgânica, que corresponde à uma parte, no total de oito (razão de 1:8 entre fase orgânica/aquosa). Para esta finalidade foram realizadas novas sínteses, empregando 10 e 15% de magnetita durante a polimerização do STY-DVB-M, mantendo os demais fatores fixos no nível máximo.

As amostras foram digeridas empregando-se água-régia + HF e analisadas por ICP-OES. Os resultados obtidos foram comparados com aqueles encontrados na condição (3333) e são apresentados na Tabela 20.

Nota-se que em média, apenas 35 a 40% de toda a magnetita adicionada na fase orgânica durante a síntese do copolímero é inserida à composição do suporte, independentemente da quantidade empregada. Assim, a maior quantidade de magnetita adicionada durante a polimerização, proporcionará a maior massa de íons de ferro inserida na matriz polimérica.

Tabela 20: Teor de Fe obtido no copolímero de STY-DVB-M pela análise de ICP-OES, utilizando diferentes porcentagens de magnetita adicionada durante a polimerização, empregando AIBN como iniciador.

Condição de síntese	Porcentagem de magnetita adicionada na polimerização (%)	Teor de íons de Fe obtido pela análise de ICP-OES (%m íons Fe/m total)	Teor de magnetita presente no suporte* (% m_{magnetita} /m total)	Teor de magnetita inserida no suporte** (%)
3333	20	6,83	8,65	43,26
3332	15	4,27	5,93	39,53
3331	10	2,56	3,56	35,56

* calculado a partir do teor de íons de ferro (ICP-OES) presente na composição da magnetita.

** magnetita efetivamente incorporada ao suporte em relação à massa total adicionada na polimerização.

Fonte: Próprio autor

A determinação desses valores foi conseguida a partir de cálculos baseados na massa molar da magnetita (Fe_3O_4 , igual a 231,5 g/mol), que contém aproximadamente 72 % de íons férricos da massa total e dos dados obtidos pelas análises de ICP-OES.

Baseado nesses resultados, considerou-se que a adição de 20% de Fe_3O_4 é ideal para a magnetização das matrizes poliméricas, visto que, o intuito do presente trabalho é a obtenção de suportes magnéticos para imobilização de enzimas, que possam ser recuperados e separados do meio reacional a partir da utilização de um campo magnético externo. Assim, acredita-se que quanto mais Fe for inserido na matriz, provavelmente maior será sua atração por um ímã.

5.2.5 Difratomia de Raios-X (DRX)

A identificação das fases da magnetita presentes nos suportes foi realizada através de difratometria de raios-x (DRX) e conduzida no software Highscore 3.0 da marca Panalytical. Os materiais com parcelas cristalinas apresentam difratogramas contendo picos e reflexões bem definidas. Por outro lado, materiais com características amorfos não apresentam um arranjo cristalino regular, e portanto, não exibem difratogramas com reflexões definidas (CULLITY; COHEN, 1978).

Em geral, a matriz polimérica não expressa uma resposta sensível à análise, visto que apresenta uma grande parcela amorfa em sua composição. Assim, o sinal capturado é do óxido de ferro que foi incorporado aos copolímeros durante as sínteses.

A fase do óxido de ferro observada nas amostras foi determinada como sendo magnetita, por apresentar os graus de difração característicos para a fase Fe_3O_4 , como registrado pelo JCPDS N° 00-019-0629 (EL GHANDOOR et al., 2012; MIJONE, 2014; RUSIANTOA et al., 2015; SWANSON et al., 1967). Os padrões de difração para as amostras, em 2θ (grau), correspondem ao plano (hkl) em uma rede cristalina, como apresentado na Tabela 21.

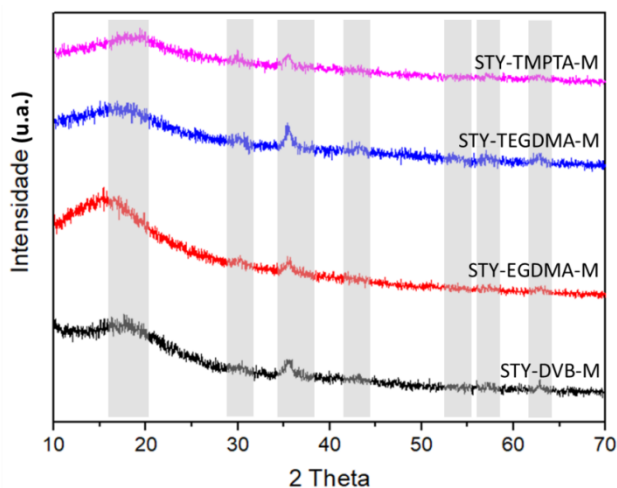
Tabela 21: Ângulos de difração (2θ) e o respectivo plano (hkl) para os picos difratados pela magnetita.

2θ (°)	Plano (hkl)
18,3	(111)
30,1	(220)
35,5	(311)
37,0	(222)
43,0	(400)
53,4	(422)
56,9	(511)
62,7	(440)

Fonte: Próprio autor

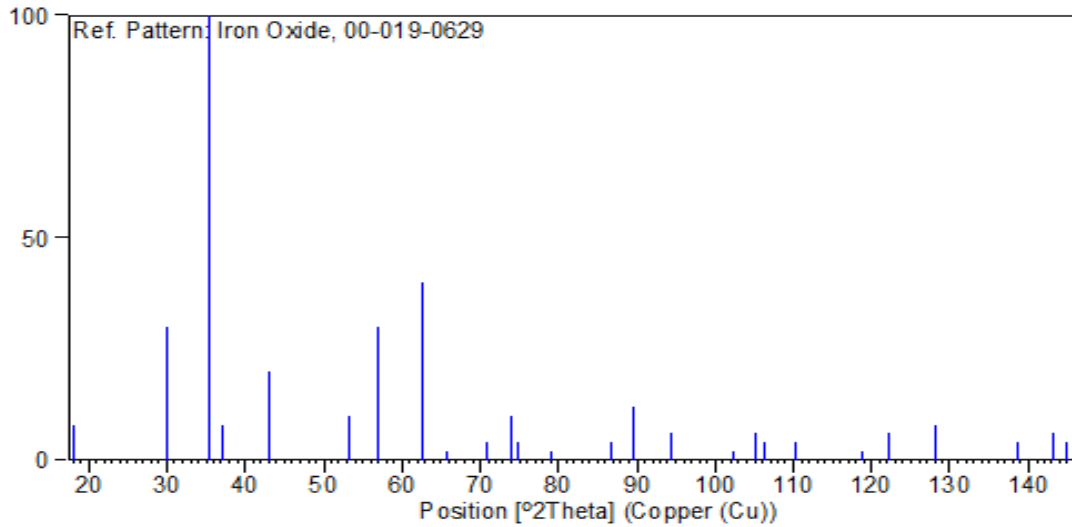
Fazendo uso do software Highscore 3.0, foi possível gerar o difratograma para cada um dos 4 copolímeros analisados (Fig. 24). Todos os difratogramas apresentaram o pico característico de difração em $2\theta = 35,5^\circ$ como o mais intenso, que corresponde à fase espinela das partículas de Fe_3O_4 e podem ser comparados ao difratograma de referência para magnetita (Fig. 25).

A largura dos picos está associada a parcela amorfa da matriz e ao tamanho do cristal formado. Como pode ser observado na Figura 24, as amostras mostram picos largos, indicando a natureza ultrafina e o pequeno tamanho dos cristalitos das partículas.

Figura 24: Difratogramas dos copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta).

Fonte: Próprio autor

Figura 25: Curva de difração de raio-X da ficha catalográfica da magnetita referenciada no *Joint Committee of Powder Diffraction Standards* (JCPDS N° 00-019-0629).



Fonte: (SWANSON et al., 1967)

De acordo com a equação de Scherrer (CULLITY; COHEN, 1978; EL GHANDOOR et al., 2012; SWANSON et al., 1967), o tamanho do cristalito ($D_{\text{cristalito}}$) para a amostra é dado pela Equação 11.

$$D_{\text{cristalito}} = k \lambda / \beta \cdot \cos \theta \quad (\text{Equação 11})$$

Em que: $D_{\text{cristalito}}$ é o tamanho do cristalito; k é a constante do fator de forma, igual a 0,89; λ é o comprimento de onda da radiação do $K\text{-}\alpha\text{Cu}$, igual a 0,15405 nm; β é a largura-meia altura (FWHM) do pico de maior intensidade e θ é a metade do ângulo do pico de maior intensidade considerado no cálculo do FWHM.

Os tamanhos dos cristalitos obtidos para os diferentes copolímeros magnéticos são apresentados na Tabela 22, constatando-se a obtenção de cristais em escala picométrica (8 - 12).

Tabela 22: Tamanho dos cristalitos da magnetita inserida nos copolímeros magnéticos obtidos a partir da Equação de Scherrer.

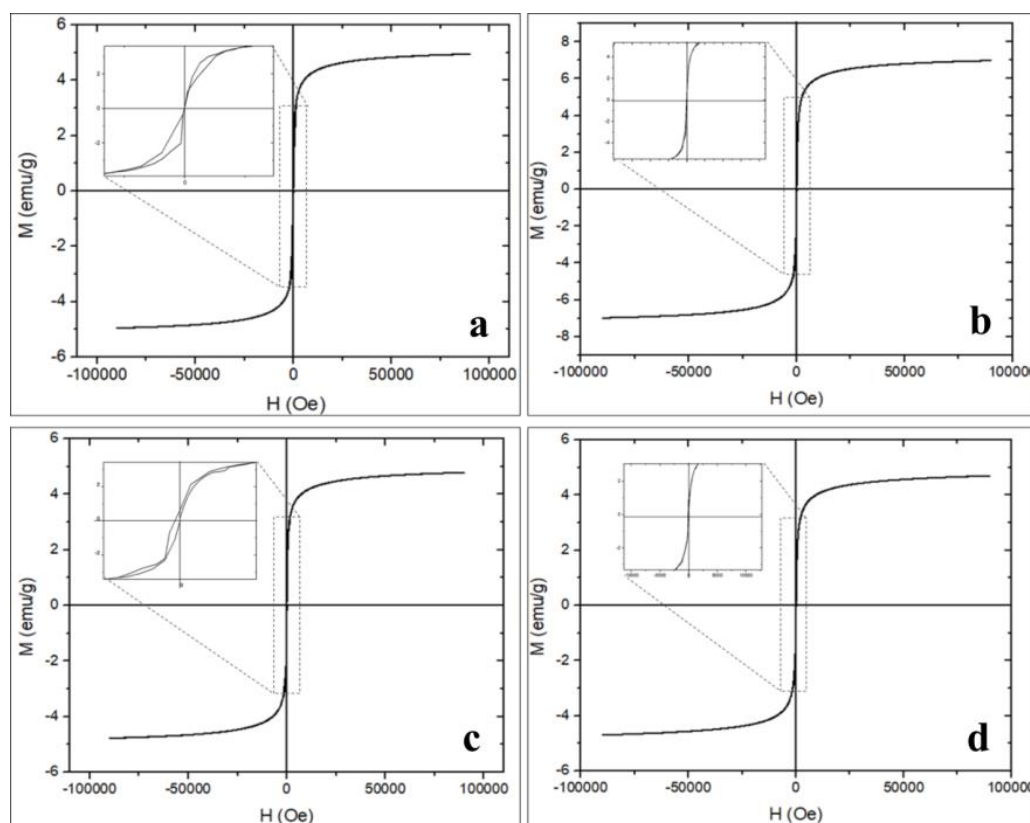
Suporte	θ (°)	FWHM	D (nm)
STY-DVB-M	17,77	0,7488	0,010
STY-EGDMA-M	17,76	0,9984	0,008
STY-TEGDMA-M	17,73	0,6240	0,012
STY-TMPTA-M	17,76	0,9984	0,008

Fonte: Próprio autor

5.2.6 Determinação da curva de magnetização (Histerese)

Para verificar as propriedades magnéticas dos materiais sintetizados, foi realizada a análise de Histerese (Fig. 26).

Figura 26: Curvas de Histerese obtidas para os copolímeros de STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.



Fonte: Próprio autor

Foi constatado que os copolímeros apresentam retentividade quase nula, característica de materiais superparamagnéticos, como as ferritas (ZHAO; ZHANG; FENG, 2012).

Os copolímeros sintetizados apresentaram saturação de magnetização entre 4 e 7 emu.g⁻¹, que apesar de não ser muito expressiva, é suficiente para permitir a atração do copolímero por um campo magnético externo.

5.2.7 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

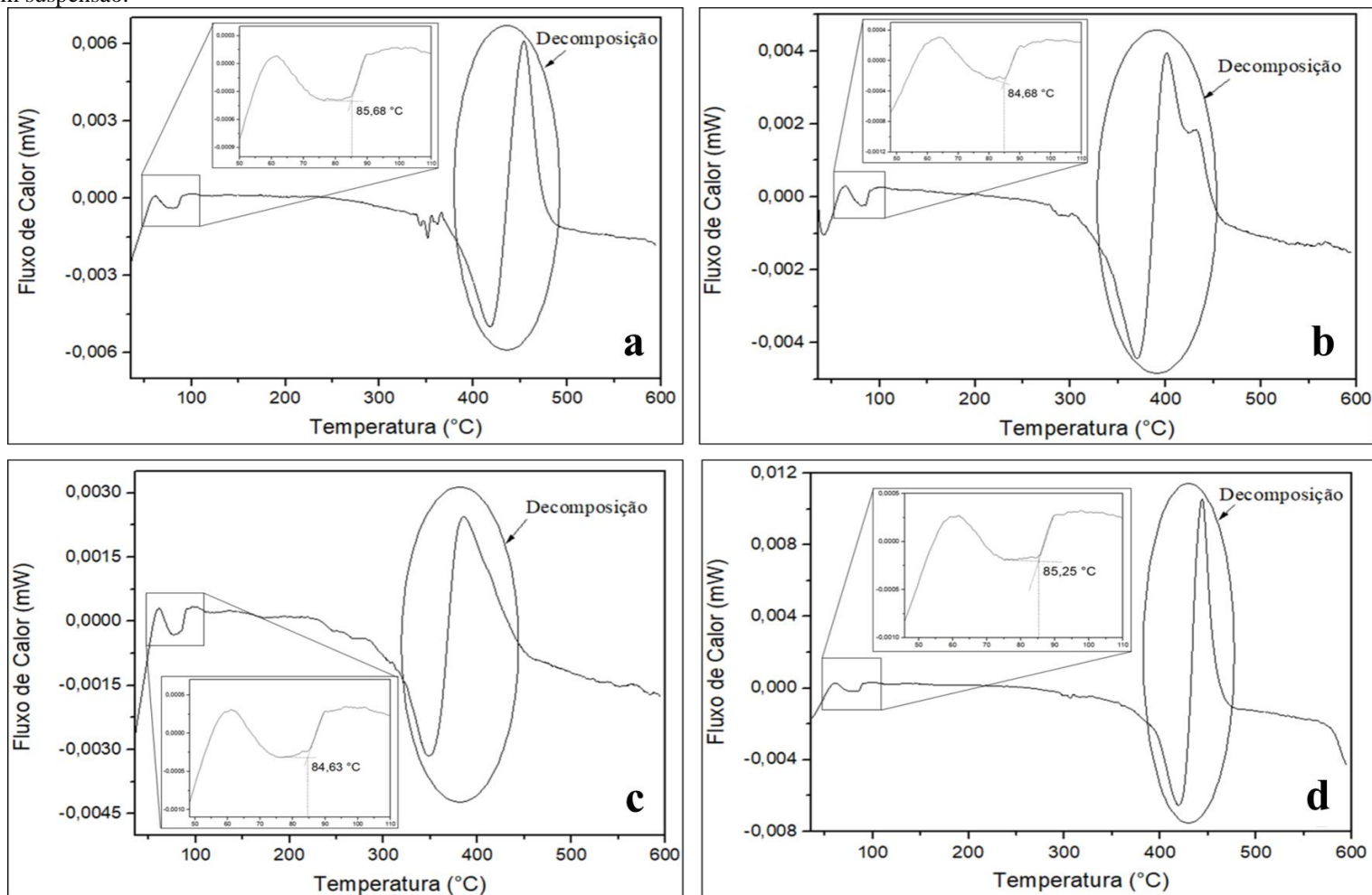
A análise de calorimetria exploratória diferencial mede a variação de entalpia, comparando uma amostra à uma referência, no decorrer de um processo de aquecimento/resfriamento (BERNAL et al., 2002). Os resultados de DSC para os copolímeros de STY-DVB-M, STY-EGDMA-M, STY-TEGDMA-M e STY-TMPTA-M estão apresentados na Figura 27 (a-d).

A decomposição dos copolímeros é observada nos eventos endo e exotérmicos ao final de cada corrida, podendo ocorrer também outros eventos no decorrer do aquecimento, o que pode ser atribuído à presença de solventes ou monômeros residuais nos poros dos copolímeros, ou ainda à oxidação da magnetita presente nas partículas poliméricas.

A curva apresentada na Figura 27a, mostra o deslocamento da linha de base, podendo assim ser obtida a temperatura de transição vítrea (tg) do copolímero de STY-DVB-M, ocorrida a 85,68 °C. A transição vítrea (tg) para o STY-EGDMA-M (Fig. 27b) ocorreu a 84,68 °C. Vale destacar que a decomposição deste copolímero ocorreu em duas etapas, e será melhor discutida no item 5.2.8. A tg para o STY-TEGDMA-M (Fig. 27c) e para o STY-TMPTA-M (Fig. 27d) ocorrem a 84,63 °C e 85,25 °C, respectivamente.

Como observado, todos os copolímeros apresentaram apenas uma temperatura de transição vítrea, concluindo-se que a síntese polimérica ocorreu de maneira eficiente, não sendo identificados monômeros residuais ou polimerização de homopolímero. Além disso, não foi observado nenhum evento de fusão, podendo-se afirmar, que os copolímeros sintetizados são amorfos (PRENNER; CHIU, 2011).

Figura 27: Curvas de DSC para os copolímeros de: a) STY-DVB-M, b) STY-EGDMA-M, c) STY-TEGDMA-M e d) STY-TMPTA-M, empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.



Fonte: Próprio autor.

5.2.8 Análise Termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica acompanha a perda de massa do material por ação da energia térmica. Dessa forma, o comportamento térmico dos copolímeros sintetizados foi estudado, visando obter a temperatura de início (T_{onset}), temperatura de degradação (T_{pico}) e temperatura de término (T_{endset}) do evento térmico. As curvas termogravimétricas (TG) dos copolímeros e suas respectivas derivadas (DTG) são apresentadas na Figura 28 (a-d).

De maneira geral, nota-se que os copolímeros são resistentes à decomposição térmica, visto que, os termogramas mantêm-se constantes até temperaturas superiores a 300°C, dando início à decomposição. Observa-se também que, com exceção ao STY-EGDMA-M, as DTGs possuem apenas um pico relevante, que é referente a degradação dos materiais poliméricos.

A DTG para o STY-EGDMA-M (Fig. 28b) apresentou dois picos referentes à degradação do material, sendo a decomposição ocorrida em duas etapas. A primeira T_{pico} ocorreu a 348,85 °C e a segunda a 405,63 °C, demonstrando a presença de um provável contaminante.

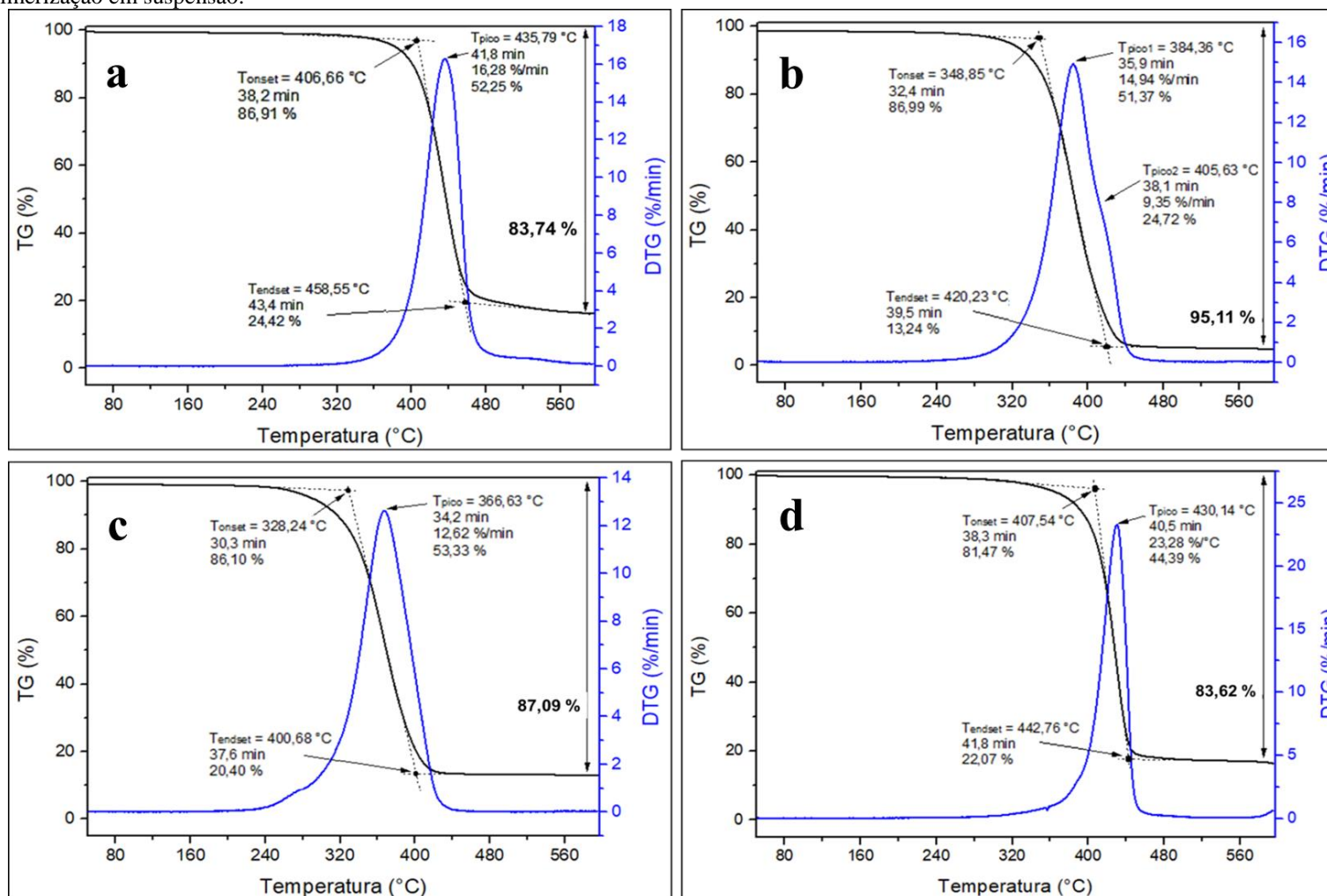
A Tabela 23 mostra as temperaturas T_{onset} , T_{pico} e T_{endset} para cada um dos copolímeros analisados.

Tabela 23: Dados termogravimétricos obtidos para os diferentes copolímeros avaliados.

Suporte	T_{onset} (°C)	T_{pico} (°C)	T_{endset} (°C)
STY-DVB-M	406,66	435,79	458,55
STY-EGDMA-M	348,85	384,36	420,23
STY-TEGDMA-M	328,24	366,63	400,68
STY-TMPTA-M	407,54	430,14	442,76

Fonte: Próprio autor.

Figura 28: Curvas TGA e DTGA para os copolímeros de: a) STY-DVB-M, b) STY-EGDMA-M, c) STY-TEGDMA-M e d) STY-TMPTA-M, empregando AIBN como iniciador na polimerização em suspensão.



Fonte: Próprio autor.

Nota-se que os copolímeros de STY-DVB-M e STY-TMPTA-M são os mais resistentes, visto que apresentam início de degradação térmica em 406,66 e 407,54 °C, respectivamente. Com relação às partículas de STY-DVB-M, esta observação provavelmente é devido ao empacotamento dos anéis aromáticos presentes no divinilbenzeno, que as tornam mais resistentes, tanto química como termicamente (THEODORO, 2018).

Shim e colaboradores (2004) atestaram que a T_{onset} das partículas de poli(estireno-co-divinilbenzeno) sintetizadas pela técnica de polimerização em emulsão, foi de 313 e 340 °C, respectivamente, quando empregado 2 e 10 % em mol de divinilbenzeno. Esse estudo mostra que quanto maior o teor de reticulante na matriz polimérica, mais elevada tende ser a T_{onset} . Dessa forma, visto que o copolímero sintetizado no presente trabalho possui 50 % (m/m) de DVB, é compreensível que sua T_{onset} seja próxima a 400 °C.

Já as partículas de STY-TMPTA-M, apresentam cadeias mais fechadas em função da estrutura do agente reticulante, tornando-as também resistentes termicamente, visto que quanto mais reticulado o copolímero, maior a resistência do material (THEODORO, 2018).

Os suportes poliméricos de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M apresentam características semelhantes, em função da similaridade de suas estruturas químicas. No entanto, o TEGDMA possui uma cadeia maior e com mais grupos ésteres, tornando as partículas de STY-TEGDMA-M menos resistentes termicamente, quando comparado ao copolímero formado com EGDMA (THEODORO, 2018).

Em outros trabalhos, também foram obtidas T_{endset} próximas às obtidas no presente estudo, como em Yan e Texter (2007) e Achilias, Karabela e Sideridou (2010), que encontraram valores de T_{endset} em torno de 400 °C para ambos os reticulantes.

5.2.9 Ângulo de contato

Esta análise permite determinar características de hidrofiliicidade e/ou hidrofobicidade de materiais sólidos. Estas características são parâmetros de grande interesse quando a aplicabilidade do material é em meio líquido.

O ângulo de contato medido foi aquele formado entre a superfície do sólido e uma das tangentes da superfície da gota que passa por um ponto que separa os três estados do sistema, ou seja, sólido, líquido e gasoso (Fig. 29). O líquido utilizado para esta análise foi água destilada, sendo o volume da gota de 10µL. As imagens foram capturadas assim que a gota

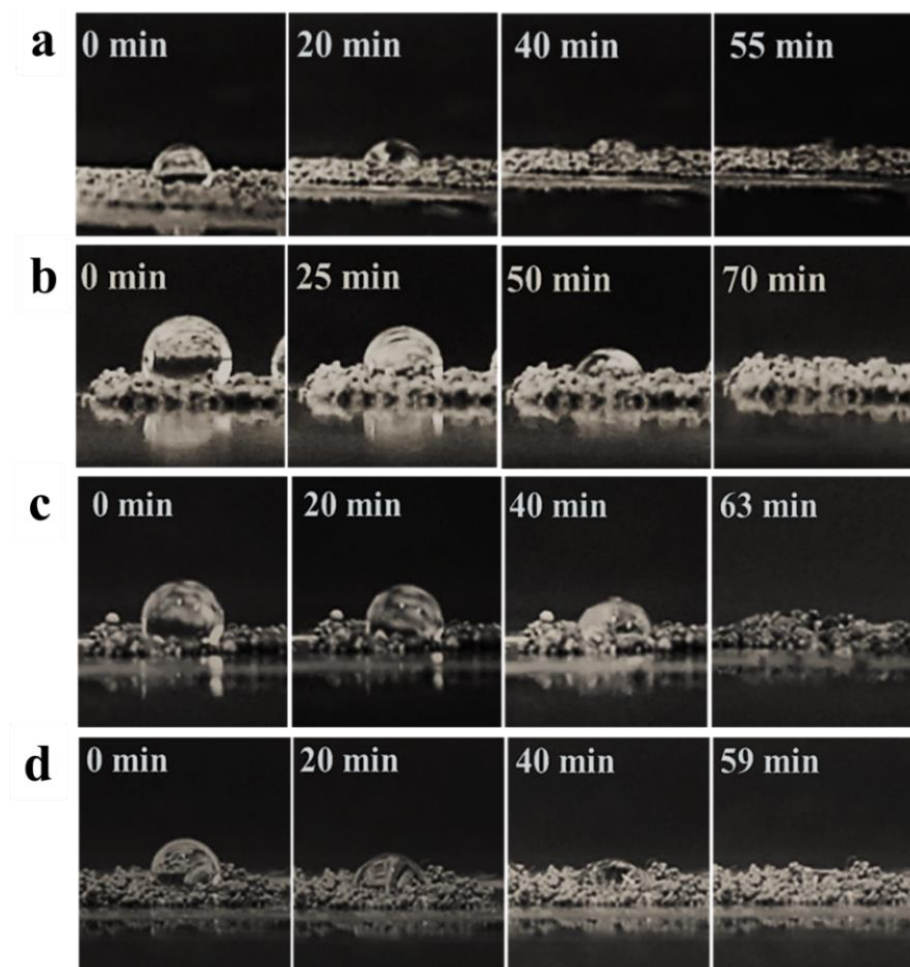
entrou em contato com a superfície do copolímero, cronometrando-se o tempo total para absorção do líquido, como observado na Tabela 24.

Tabela 24: Relação entre o ângulo de contato inicial entre a gota e a superfície da amostra e o tempo total para absorção do líquido.

Suporte	Ângulo inicial (°)	Tempo total (min)
STY-DVB-M	75,96	55
STY-EGDMA-M	106,39	70
STY-TEGDMA-M	101,00	63
STY-TMPTA-M	98,13	59

Fonte: Próprio autor

Figura 29: Imagens da gota de água sobre as superfícies das amostras no instante zero até a completa adsorção pelo material: STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d). Copolímeros sintetizados empregando AIBN como iniciador.



Fonte: Próprio autor

A partir da variação dos ângulos de contato iniciais e dos tempos para total absorção da gota, é possível constatar que o agente reticulante empregado, interfere nos parâmetros de molhabilidade nos diferentes copolímeros analisados.

De acordo com a Tabela 24, o copolímero de STY-EGDMA-M, foi o que apresentou tanto o maior ângulo inicial (106,39 °), como também o que levou mais tempo para absorver a gota de água (70 min), demonstrando o caráter mais hidrofóbico entre os demais. Esta característica também foi observada pelos copolímeros de STY-TEGDMA-M e STY-TMPTA-M, apresentando tempos de absorção de 63 e 59 min, respectivamente.

O copolímero de STY-DVB-M foi o material que apresentou o menor ângulo de contato (75,96 °) e o menor tempo para completa absorção da gota (55 min), demonstrando menor característica hidrofóbica dentre os copolímeros magnéticos sintetizados no presente trabalho.

O perfil de molhabilidade é um parâmetro importante para o processo de imobilização de enzimas, tanto com relação ao meio no qual a enzima será imobilizada (orgânico ou aquoso), como na escolha do método (adsorção, ligação covalente, encapsulamento) e ao tipo de enzima, visto que diferentes interações enzima/suporte são realizadas durante o processo de imobilização. Em se tratando de lipases, sabe-se que essas enzimas apresentam elevadas atividades catalíticas quando imobilizadas em suportes com determinado grau de hidrofobicidade (SVENDSEN, 2016).

5.2.10 Densidade

5.2.10.1 Densidade Relativa de Sólidos (D_s) e Aparente (D_a)

No presente trabalho a densidade relativa (D_s) dos suportes poliméricos magnéticos, sintetizados utilizando AIBN como agente iniciador, foi realizada adotando o heptano como solvente, visto que este é o mesmo solvente utilizado no momento da imobilização de enzimas neste suporte. A densidade aparente (D_a) das matrizes poliméricas também foi calculada, empregando a razão entre a massa e o volume do suporte (considerando o vazio dos poros dos copolímeros).

A Tabela 25 apresenta os valores de densidade relativa e aparente, determinadas empiricamente, para todos os copolímeros magnetizados sintetizados.

Tabela 25: Densidades relativas e aparentes para os diferentes copolímeros magnéticos sintetizados com AIBN como iniciador.

Suporte (agente iniciador AIBN)	Densidade	
	Relativa (D_s) $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Aparente (D_a) $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$
STY-DVB-M	1,2720	0,8012
STY-EGDMA-M	1,2225	0,5746
STY-TEGDMA-M	1,2386	0,6919
STY-TMPTA-M	1,1537	0,5692

Fonte: Próprio autor.

Os dados obtidos mostram que o STY-DVB-M é o mais denso entre os copolímeros, seguido pelo STY-TEGDMA-M, STY-EGDMA-M e finalmente pelo STY-TMPTA-M.

Este resultado já era esperado, visto que, visualmente no momento da realização do teste, as partículas de STY-DVB-M quando misturadas ao heptano, mantinham-se no fundo do balão, totalmente imersas no solvente. Adicionado à este fato, tem-se a conformação das cadeias poliméricas deste material, que é a mais compacta entre os demais copolímeros estudados, devido às características do reticulante (DVB).

5.2.11 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Os copolímeros sintetizados (STY-DVB-M, STY-EGDMA-M, STY-TEGDMA-M e STY-TMPTA-M) foram caracterizados quanto sua morfologia por microscopia eletrônica de varredura, em microscópio da marca HITACHI, modelo TM3000.

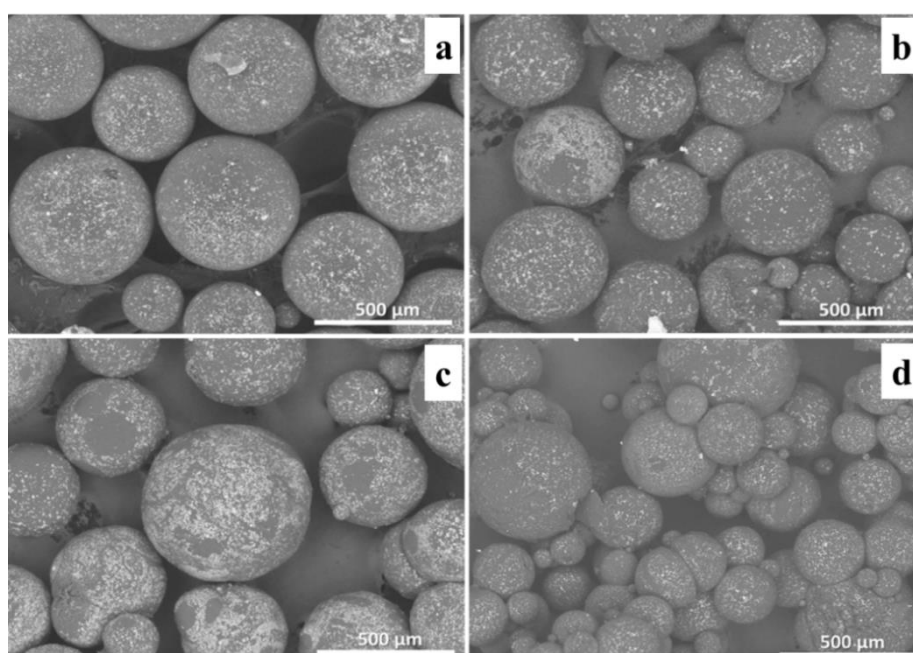
A Figura 30 apresenta as micrografias das partículas sintetizadas empregando AIBN como iniciador, com aumento de 100 vezes. É possível observar o formato esférico e homogêneo das partículas poliméricas, independentemente do agente reticulante utilizado. Resultados semelhantes foram encontrados por Shim et al. (2004), que estudando a síntese de partículas de poli (estireno-co-divinilbenzeno), compostas por diferentes concentrações de divinilbenzeno (5 a 75%) e estireno como monômero base, observaram que em concentrações mais elevadas de divinilbenzeno, as partículas se apresentavam mais esféricas.

Os aglomerados de magnetita (Fig. 30) podem ser percebidos na superfície do material polimérico, demonstrando como o óxido está distribuído e aderido aos copolímeros. As zonas brancas visíveis nas micrografias são as áreas de maior concentração de ferro.

A Figura 31 ilustra as partículas poliméricas sintetizadas empregando BPO como agente iniciador. No entanto, diferentemente do constatado nas partículas sintetizadas com AIBN, estas apresentam-se disformes, não esféricas, lembrando “esferas ocas”. Essa observação provavelmente está relacionada às interações dos copolímeros (sintetizados com os diferentes iniciadores) com os solventes utilizados na síntese e ao processo de secagem dessas partículas.

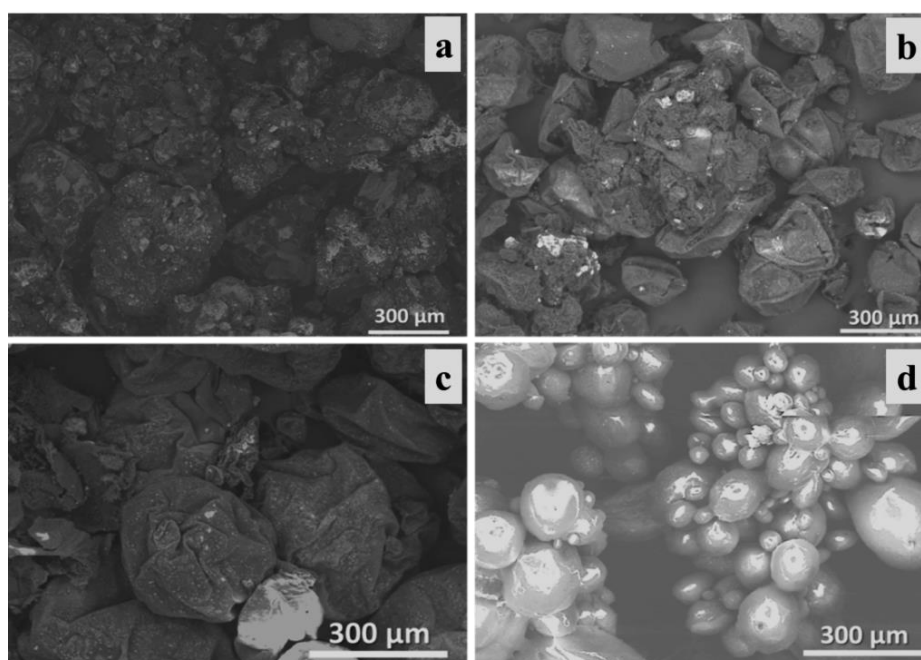
A cadeia polimérica iniciada com BPO, ao ser solvatada, aprisiona gotículas maiores do solvente heptano, quando comparado aos copolímeros sintetizados com AIBN, visto que apresenta uma decomposição mais lenta, formando cadeias mais longas do que aquelas iniciadas com AIBN, que são mais reticuladas (AGUIAR et al., 2014; THEODORO, 2018). Durante a secagem das partículas, no momento em que o solvente ainda aprisionado na matriz é eliminado, pode ocorrer o colapso da estrutura polimérica. O colapso dessa estrutura porosa é atribuído às forças de coesão quando as cadeias poliméricas solvatadas se aproximam, devido à perda de solvente. Este evento é mais propício nas partículas iniciados pelo BPO, visto que o “vazio” originado pela evaporação do solvente é maior (OKAY, 2000).

Figura 30: Micrografias dos copolímeros à base de estireno empregando AIBN como iniciador com aumento de 100 X obtidas pelo MEV: STY-DVB-M: (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d).



Fonte: Próprio autor.

Figura 31: Micrografias dos copolímeros à base de estireno empregando BPO como iniciador, com aumento de 100 X obtidas pelo MEV: STY-DVB-M: (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d).



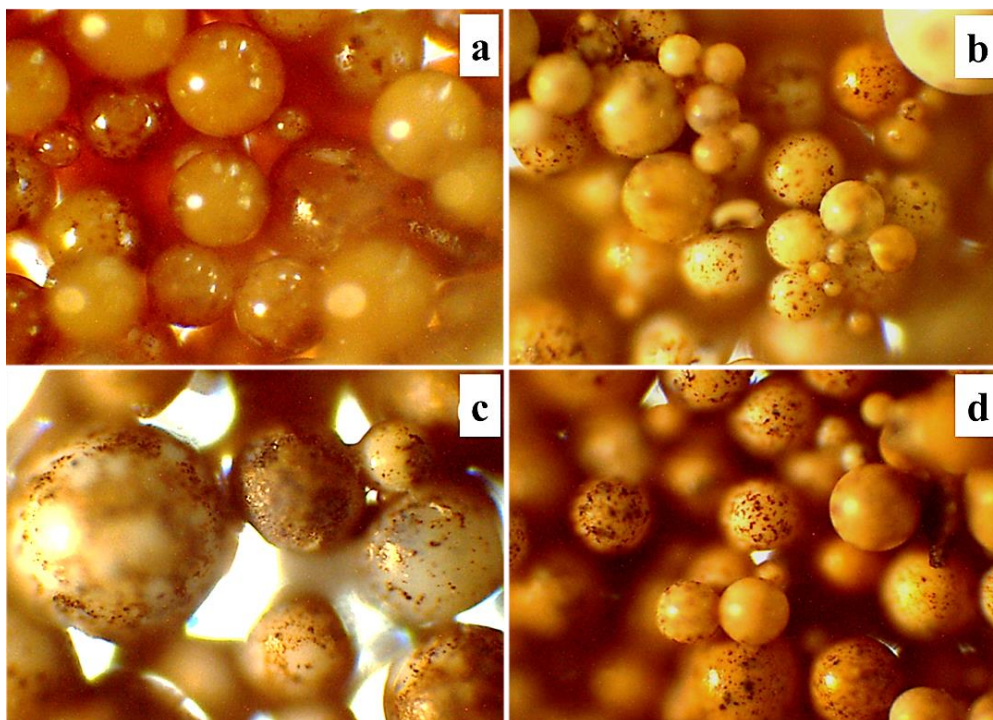
Fonte: Próprio autor.

5.2.12 Microscopia óptica comum (MOC)

Com o intuito de complementar as análises realizadas pela microscopia eletrônica de varredura, os diferentes copolímeros sintetizados também foram caracterizados quanto sua morfologia por microscopia óptica comum, em microscópio da marca OPTON MICROSCÓPIOS, modelo TNB-01T-INF-LED.

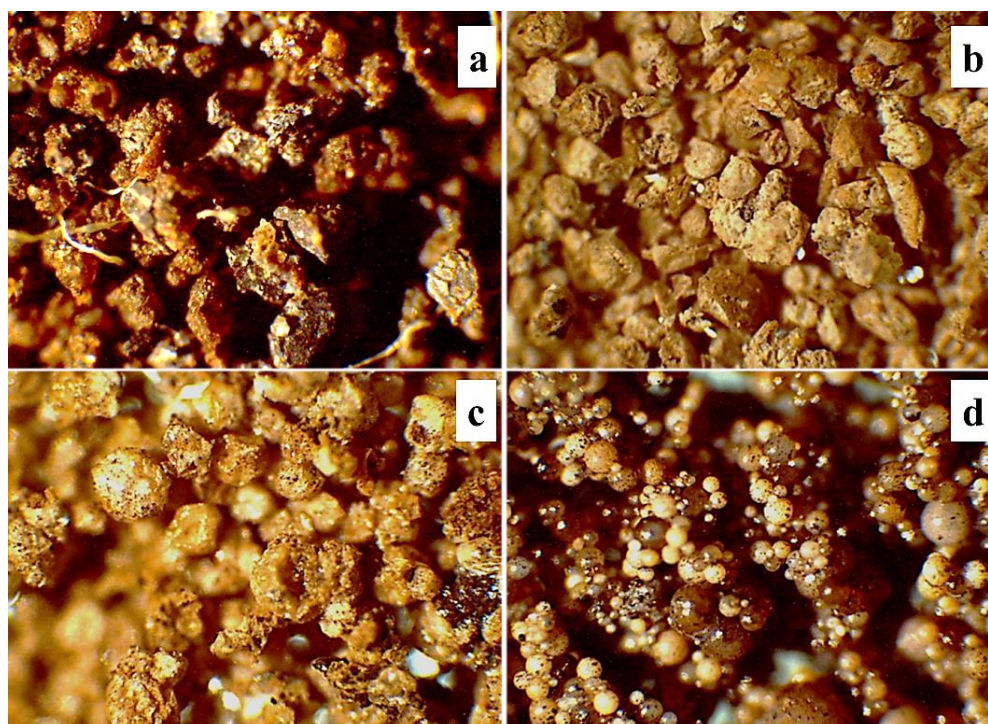
Assim como nas micrografias obtidas pelo MEV, é possível notar o formato esférico e homogêneo das partículas poliméricas empregando AIBN como iniciador (Fig. 32), e o aspecto disforme da matriz obtida quando empregou-se BPO (Fig. 33). As maiores concentrações de magnetita podem ser percebidas nas zonas vermelho escuro nas micrografias.

Figura 32: Micrografias dos copolímeros à base de estireno obtidas pelo MOC: STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), utilizando AIBN como agente iniciador.



Fonte: Próprio autor.

Figura 33: Micrografias dos copolímeros à base de estireno obtidas pelo MOC: STY-DVB-M (a), STY-EGDMA-M (b), STY-TEGDMA-M (c) e STY-TMPTA-M (d), utilizando BPO como agente iniciador.



Fonte: Próprio autor.

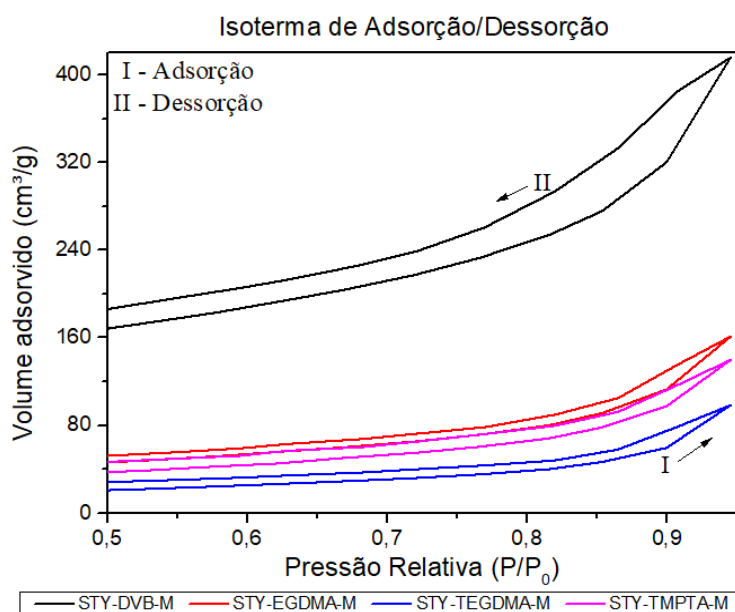
Nota-se pelas micrografias das Figuras 31d e 33d que as partículas de STY-TMPTA-M exibem formas mais esféricas dentre os copolímeros sintetizados com BPO. Esta observação pode ser explicada pelo fato deste copolímero ser o mais reticulado dentre os demais, dispondo de menos espaços “vazios” entre as cadeias poliméricas. Isso torna sua estrutura menos suscetível às forças de coesão durante o processo de secagem, colapsando menos, mantendo o formato esférico das partículas (AGUIAR et al., 2014; OKAY, 2000).

5.2.13 Análise Textural pelo Método de BET (Braunauer, Emmet e Teller)

Os copolímeros magnéticos foram caracterizados quanto à sua área superficial, diâmetro e volume de poros empregando a técnica de adsorção-dessorção física de nitrogênio. Essa técnica consiste na passagem de uma mistura de N₂ (g) e He (g) sobre a amostra sólida à pressões relativas.

As isotermas obtidas para os diferentes copolímeros empregando AIBN e BPO como agente iniciador, são mostradas nas Figuras 34 e 35, respectivamente. Observa-se que todas as isotermas apresentam histerese do tipo H3 (Fig. 36), em que a curva da adsorção é próxima à curva de dessorção. Dessa forma, é possível determinar que os poros desses suportes apresentam formatos de cunhas, cones e/ou placas paralelas (RODELLA, 2001).

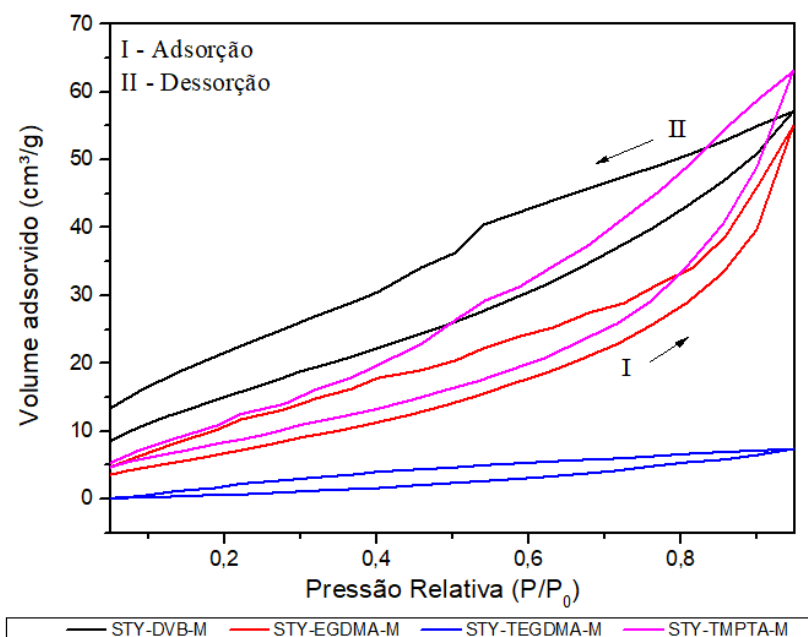
Figura 34: Isotermas de adsorção e dessorção obtidas para os copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando AIBN como agente iniciador.



* P₀ é a pressão de saturação e P é a pressão de equilíbrio.

Fonte: Próprio autor

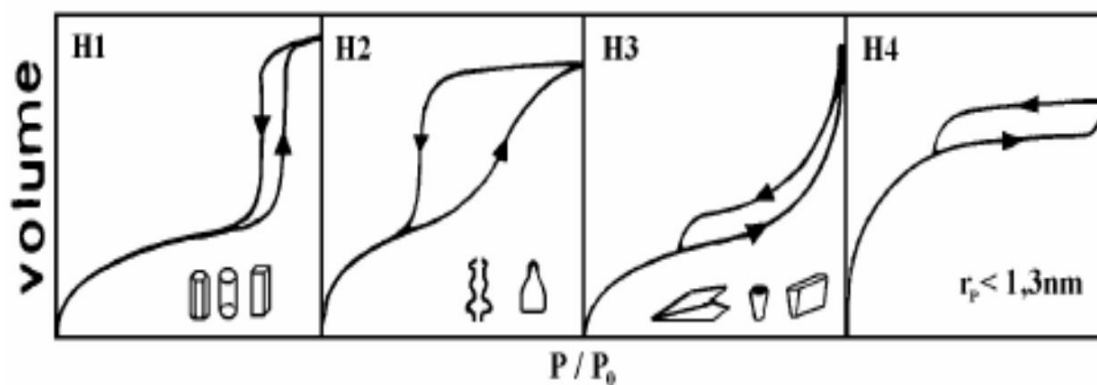
Figura 35: Isotermas de adsorção e dessorção para os copolímeros de STY-DVB-M (preto), STY-EGDMA-M (vermelho), STY-TEGDMA-M (azul) e STY-TMPTA-M (magenta), empregando BPO como agente iniciador.



* P_0 é a pressão de saturação e P é a pressão de equilíbrio.

Fonte: Próprio autor

Figura 36: Histereses mais frequentes em isotermas de adsorção e sua relação com o formato dos poros.



Fonte: (RODELLA, 2001)

Os resultados referentes a área superficial, diâmetro e volume de poro dos copolímeros sintetizados empregando AIBN e BPO como iniciador, são apresentados na Tabela 26.

Tabela 26: Resultados obtidos pela análise de BET para os copolímeros magnéticos.

	Suporte	Área Superficial (m²/g)	Diâmetro de poro (nm)	Volume de poros (cm³/g)
Iniciador: AIBN	STY-DVB-M	437	5,9	0,64
	STY-EGDMA-M	114	8,8	0,25
	STY-TEGDMA-M	44	13,8	0,15
	STY-TMPTA-M	87	9,9	0,22
Iniciador: BPO	STY-DVB-M	65	5,4	0,088
	STY-EGDMA-M	36	9,5	0,085
	STY-TEGDMA-M	5	9,5	0,0115
	STY-TMPTA-M	41	9,6	0,098

Fonte: Próprio autor

Nota-se que o STY-DVB-M apresentou a maior área superficial, quando comparada aos demais copolímeros sintetizados com o mesmo agente iniciador. Esta observação está associada ao tipo de estrutura que a reticulação do divinilbenzeno proporciona à matriz polimérica, visto que o crescimento das cadeias ocorre de forma mais próxima umas das outras, permitindo o aprisionamento de um maior número de gotículas de heptano com tamanhos menores, elevando a porosidade dessa matriz (OKAY, 2000; THEODORO, 2018).

Todos os materiais obtidos podem ser classificados como mesoporosos, visto que possuem poros com diâmetros entre 2 e 50 nm. Nota-se também que o iniciador não interferiu de forma marcante nos tamanhos dos diâmetros dos poros, que mantiveram-se na faixa de 5 a 10 nm. No entanto, a área superficial e o volume dos poros apresentaram diferenças expressivas, sendo estes valores, diminuídos em cerca de 7 vezes, quando foi empregado o iniciador BPO nas polymerizações.

As diferenças texturais observadas nas partículas poliméricas pela utilização dos dois tipos de iniciadores, podem ser explicadas em função de suas velocidades de decomposição (formação de radicais livres) em uma determinada temperatura e solvente utilizados durante a polimerização, além do comportamento obtido durante o processo de secagem (AGUIAR et al., 2014; OKAY, 2000).

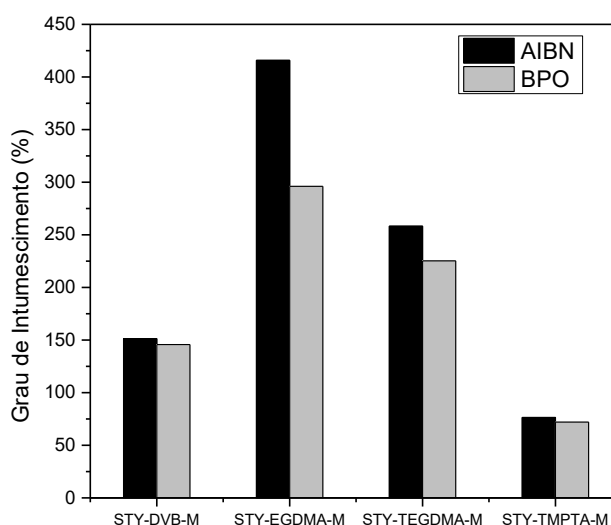
Estudos relataram perda de porosidade de esferas poliméricas obtidas por estireno associado ao DVB, quando solvatadas em tolueno antes de serem secas em temperaturas elevadas. Esta perda de porosidade foi justificada devido ao colapso dos poros durante o processo de secagem das partículas (OKAY, 2000).

5.2.14 Grau de Intumescimento

O Grau de intumescimento foi realizado a fim de se determinar o grau de absorção de um fluido (heptano) pelas partículas poliméricas. A densidade das reticulações ou a quantidade de ligações cruzadas é um dos fatores que mais influencia o intumescimento de polímeros. Quanto maior o grau de reticulação e mais compacta a conformação das cadeias, menor será o “inchaço” das partículas na presença de um fluido, quando comparado à polímeros com menores graus de reticulação (OKAY, 2000; SANTOS, 2015).

Nota-se (Fig. 37) que o agente iniciador praticamente não interferiu nas características de intumescimento dos copolímeros estudados, visto que os valores de grau de intumescimento variaram consideravelmente apenas em função dos diferentes reticulantes testados. No entanto, percebe-se um discreto aumento no grau de intumescimento das partículas sintetizadas com AIBN, provavelmente porque os copolímeros sintetizados com este iniciador, apresentaram, de modo geral, maior área superficial e volume de poros (Item 5.2.13), facilitando a absorção do solvente.

Figura 37: Grau de intumescimento dos copolímeros sintetizados empregando AIBN e BPO como iniciadores.



Os materiais que apresentaram os maiores graus de intumescimento foram STY-EGDMA-M (415,85 %) e STY-TEGDMA-M (258,19 %), ou seja, as partículas desses copolímeros absorveram maiores quantidades do solvente, sendo o STY-EGDMA-M o que apresenta possivelmente a maior afinidade pelo heptano. O baixo grau de intumescimento observado pelos suportes de STY-DVB-M e de STY-TMPTA-M, em relação aos demais já era esperado, visto que são matrizes mais reticuladas (OKAY, 2000; SANTOS, 2015).

Uhl e colaboradores (2001) sintetizaram copolímeros à base de metacrilato de metila e DVB como agente reticulante em diferentes proporções, e o melhor resultado foi obtido para o copolímero com 40 % de DVB, que apresentou grau de intumescimento de 300 %, empregando tetra-hidrofurano como solvente para o teste.

5.3 CARACTERÍSTICAS DOS BIOCATALISADORES SINTETIZADOS

5.3.1 Atividade enzimática dos biocatalisadores sintetizados

Visando determinar a adequação das matrizes poliméricas sintetizadas para imobilização de enzimas, foram realizados testes de imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) por adsorção física nos diferentes copolímeros obtidos. Foram empregados os copolímeros de STY-DVB-M, STY-EGDMA-M, STY-TEGDMA-M e STY-TMPTA-M sintetizados nas melhores condições experimentais (determinadas no Item 5.1.3) e empregando AIBN e BPO, totalizando 8 suportes.

O poder catalítico dos biocatalisadores foi avaliado pela hidrólise do butirato de metila (HBM) e pela esterificação do ácido oleico e etanol (EOE). Os valores das atividades hidrolíticas e sintéticas são apresentados na Tabela 27.

Quando se trata de imobilização de enzimas, um fator muito importante é encontrar o conjunto ideal enzima/suporte/substrato. A partir dos resultados apresentados na Tabela 27, nota-se que todos os biocatalisadores sintetizados foram capazes de expressar atividades catalíticas em ambos os substratos empregados, demonstrando a adequação dos suportes sintetizados para a aplicação almejada.

Tabela 27: Atividades enzimáticas dos biocatalisadores obtidas a partir da hidrólise do butirato de metila (HBM) e da esterificação do ácido oleico e etanol (EOE).

Agente iniciador	Suporte	HBM Atividade (U·g ⁻¹)	EOE Atividade (U·g ⁻¹)
AIBN	STY-DVB-M	115 ± 16	188 ± 1
	STY-EGDMA-M	570 ± 48	202 ± 1
	STY-TEGDMA-M	710 ± 9	199 ± 1
	STY-TMPTA-M	540 ± 15	183 ± 1
BPO	STY-DVB-M	150 ± 41	48 ± 1
	STY-EGDMA-M	397 ± 59	233 ± 1
	STY-TEGDMA-M	866 ± 77	235 ± 1
	STY-TMPTA-M	299 ± 32	113 ± 1

Fonte: Próprio autor

Os derivados imobilizados obtidos pelos suportes de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M apresentaram os valores mais elevados de atividades hidrolítica e sintética, para os dois agentes iniciadores. Esses resultados corroboram com os dados de grau de intumescimento apresentados no Item 5.2.14, ou seja, quanto maior o grau de intumescimento do suporte, maior a possibilidade da adsorção da lipase nas partículas poliméricas durante o processo de imobilização, que ocorreu em meio heptano.

Resultados semelhantes foram obtidos por Silva (2017), que encontrou atividades próximas à 120 U.g⁻¹ para a lipase de *Candida rugosa* (LCR) imobilizada em suporte similar ao STY-DVB-M sintetizado com AIBN, a partir da esterificação do oleato de etila.

5.3.2 Estabilidade térmica dos biocatalisadores selecionados

A estabilidade térmica dos biocatalisadores obtidos pela imobilização da lipase CALB nos suportes de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M foi avaliada, visto que apresentaram as atividades catalíticas mais expressivas, dentre todos os derivados imobilizados testados.

A atividade hidrolítica residual foi quantificada a partir da hidrólise do butirato de metila, após a incubação dos biocatalisadores em meio heptano a 50 °C por até 240 min. Os valores obtidos foram comparados com o da lipase livre.

Os coeficientes de desativação térmica (k_d) e tempos de meia-vida ($t_{1/2}$) são apresentados na Tabela 28 e a comparação das atividades residuais é mostrada na Figura 38.

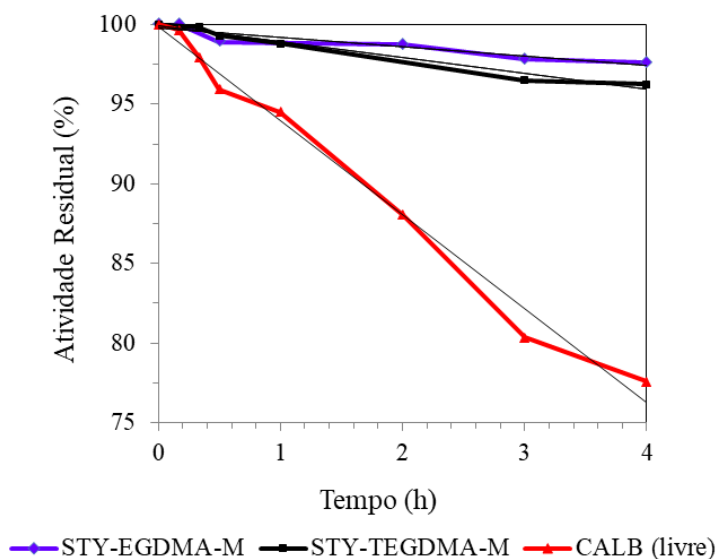
Tabela 28: Constante de desativação térmica (k_d) e tempo de meia-vida ($t_{1/2}$) para a lipase CALB livre e imobilizada nos copolímeros de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M, sintetizados empregando AIBN como agente iniciador.

Biocatalisador	k_d (h^{-1})	$t_{1/2}$ (h)	Corr
CALB imobilizada em STY-EGDMA-M	$3,18 \times 10^{-2}$	21,60	0,890
CALB imobilizada em STY-TEGDMA-M	$5,64 \times 10^{-2}$	12,33	0,973
CALB livre	0,43	1,60	0,987

Fonte: próprio autor.

A lipase CALB imobilizada no STY-EGDMA-M apresentou um valor de K_d 14 vezes superior ao obtido pela sua forma livre, revelando um $t_{1/2}$ de 21,60 h. Quando imobilizada no STY-EGDMA-M o valor de K_d foi 8 vezes maior que o da lipase livre e o tempo de meia-vida obtido foi de 12,33h. Ambos os derivados imobilizados mantiveram cerca de 96-97% da sua atividade inicial após 4h a 50 °C.

Figura 38: Decaimento da atividade enzimática dos biocatalisadores avaliados e ajuste linear dos dados, em função do tempo de incubação a 50°C.



Fonte: Próprio autor

Os valores obtidos foram superiores aos encontrados por outros autores, que avaliaram a estabilidade térmica de diferentes enzimas imobilizadas em suporte polimérico de estireno divinilbenzeno magnetizado. A lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada apresentou um tempo de meia-vida de 3,12h (SILVA et al., 2016) e a de *Burkholderia cepacia* de 11,36 h (BENTO, 2015).

Os resultados indicam que o processo de imobilização forneceu maior estabilidade térmica à enzima, elevando consideravelmente seu tempo de meia-vida, confirmando uma das principais vantagens da técnica de imobilização (BENTO et al., 2017; GUIBAN, 2006; RODRIGUES et al., 2019; VENDITTI et al., 2015).

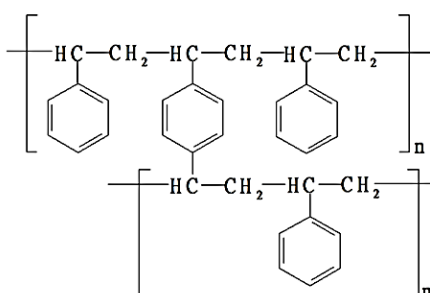
5.4. COMPARAÇÃO DOS DIFERENTES SUPORTES SINTETIZADOS

Essa seção tem como objetivo compilar as informações referentes aos diferentes copolímeros magnéticos sintetizados a partir do desenvolvimento do trabalho experimental realizado, incluindo as condições operacionais de manufatura dos copolímeros, rendimentos de polimerização, propriedades morfológicas, térmicas e magnéticas. Adicionalmente serão inseridas as propriedades catalíticas dos biocatalisadores obtidos pela imobilização da lipase B de *Candida antarctica* nos suportes sintetizados.

Essas informações serão fornecidas em forma de ficha técnica, apresentadas nos Quadros de 1 a 4, e tem como finalidade a orientação para utilização dos suportes sintetizados em diferentes aplicações, dando continuidade aos estudos que vêm sendo realizados nessa linha de pesquisa.

Dessa forma, conclui-se que, dentre os copolímeros obtidos no presente trabalho, o STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M, sintetizados com AIBN como agente iniciador, são considerados os mais adequados para a imobilização de lipases, visto que além de apresentarem os melhores rendimentos de síntese, demonstraram maior grau de intumescimento, resultando na obtenção dos valores mais elevados de atividades catalíticas, quando imobilizados com a lipase CALB. Esses resultados são muito promissores no que tange à busca por novos materiais que possam ser utilizados como suportes para imobilização de enzimas, devido à escassez de dados na literatura referentes à copolímeros magnéticos à base de estireno que empregam agentes reticulantes diferentes do divinilbenzeno.

Quadro 1: Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-divinilbenzeno magnetizado (STY-DVB-M)

Propriedades		
Nomenclatura		STY-DVB-M
Morfologia da partícula		Esférica, mesoporosa
Matriz		Poly(Sty-co-DVB) magnetizada
Agente iniciador		AIBN
Condição de síntese (total)*	50% M / 50% S; 60% R / 40% E; 60% T / 40% H; 20% Ma*	
Condição de síntese (PU)*	40% M / 60% S; 45% R / 55% E; 60% T / 40% H; 20% Ma*	
Estrutura química		
Rendimento de síntese (η_{total})	%	87,27
Rendimento de síntese (η_{PU})	%	60,88
Umidade da partícula	%	Máx 10
Densidade relativa da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	1,272
Densidade aparente da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	0,8012
Ângulo de contato (água)	°	75,69
Tempo de absorção de 1 gota (água)	min	55
Área superficial	$m^2 \cdot g^{-1}$	437
Volume médio de poros	$mL \cdot g^{-1}$	0,64
Diâmetro médio de poros	nm	5,9
Grau de intumescimento	%	2,51
T_{onset} de decomposição	°C	417,6
T_{pico} de decomposição	°C	435,9
T_{endset} de decomposição	°C	453,9
Temperatura de transição vítrea (T_g)	°C	85,7
Atividade da CALB na HBM	$U \cdot g^{-1}$	115 ± 16
Atividade da CALB na EOE	$U \cdot g^{-1}$	188 ± 1

*M = monômeros, S = solventes (heptano+toluol), R = reticulante, E = estireno, T = toluol, H = heptano, Ma = magnetita

Fonte: Próprio autor

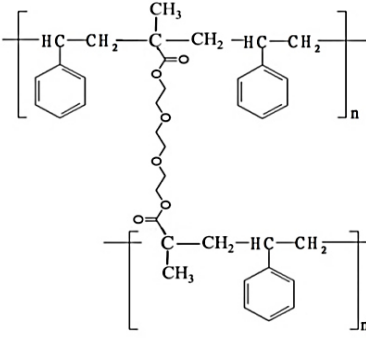
Quadro 2: Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-dimetacrilato de etilenoglicol magnetizado (STY-EGDMA-M)

Propriedades		
Nomenclatura	STY-EGDMA-M	
Morfologia da partícula	Esférica, mesoporosa	
Matriz	Poly(Sty-co-EGDMA) magnetizada	
Agente iniciador	AIBN	
Condição de síntese (total)*	50% M / 50% S; 60% R / 40% E; 60% T / 40% H; 20% Ma*	
Condição de síntese (PU)*	30% M / 70% S; 30% R / 70% E; 40% T / 60% H; 20% Ma*	
Estrutura química		
Rendimento de síntese (η_{total})	%	86,15
Rendimento de síntese (η_{PU})	%	90,56
Umidade da partícula	%	Máx 10
Densidade relativa da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	1,223
Densidade aparente da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	0,5746
Ângulo de contato (água)	°	106,39
Tempo de absorção de 1 gota (água)	min	70
Área superficial	$m^2 \cdot g^{-1}$	114
Volume médio de poros	$mL \cdot g^{-1}$	0,25
Diâmetro médio de poros	nm	8,8
Grau de intumescimento	%	5,16
T_{onset} de decomposição	°C	369,3
T_{pico} de decomposição	°C	384,4
T_{endset} de decomposição	°C	400,7
Temperatura de transição vítrea (T_g)	°C	84,7
Atividade da CALB na HBM	$U \cdot g^{-1}$	570 ± 48
Atividade da CALB na EOE	$U \cdot g^{-1}$	202 ± 1

*M = monômeros, S = solventes (heptano+toluol), R = reticulante, E = estireno, T = toluol, H = heptano, Ma = magnetita

Fonte: Próprio autor

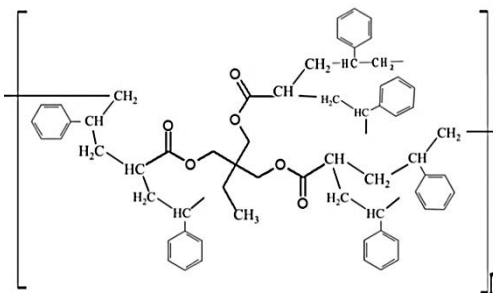
Quadro 3: Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-dimetacrilato de trietilenoglicol magnetizado (STY-TEGDMA-M)

Propriedades		
Nomenclatura		STY-TEGDMA-M
Morfologia da partícula		Esférica, mesoporosa
Matriz		Poly(Sty-co-TEGDMA) magnetizada
Agente iniciador		AIBN
Condição de síntese (total)*	50% M / 50% S; 60% R / 40% E; 60% T / 40% H; 20% Ma*	
Condição de síntese (PU)*	30% M / 70% S; 45% R / 55% E; 50% T / 50% H; 20% Ma*	
Estrutura química		
Rendimento de síntese (η_{total})	%	66,35
Rendimento de síntese (η_{PU})	%	85,00
Umidade da partícula	%	Máx 10
Densidade relativa da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	1,239
Densidade aparente da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	0,6919
Ângulo de contato (água)	°	101,00
Tempo de absorção de 1 gota (água)	min	63
Área superficial	$m^2 \cdot g^{-1}$	44
Volume médio de poros	$mL \cdot g^{-1}$	0,15
Diâmetro médio de poros	nm	13,8
Grau de intumescimento	%	3,58
T_{onset} de decomposição	°C	349,1
T_{pico} de decomposição	°C	366,9
T_{endset} de decomposição	°C	385,5
Temperatura de transição vítrea (T_g)	°C	84,6
Atividade da CALB na HBM	$U \cdot g^{-1}$	710 ± 9
Atividade da CALB na EOE	$U \cdot g^{-1}$	199 ± 1

*M = monômeros, S = solventes (heptano+toluol), R = reticulante, E = estireno, T = toluol, H = heptano, Ma = magnetita

Fonte: Próprio autor

Quadro 4: Condições de síntese e propriedades físicas e químicas do copolímero de estireno-triacrilato de trimetilolpropano magnetizado (STY-TMPTA-M)

Propriedades		
Nomenclatura		STY-TMPTA-M
Morfologia da partícula		Esférica, mesoporosa
Matriz		Poly(Sty-co-TMPTA) magnetizada
Agente iniciador		AIBN
Condição de síntese (total)	50% M / 50% S; 60% R / 40% E; 60% T / 40% H; 20% Ma*	
Condição de síntese (PU)	50% M / 50% S; 45% R / 55% E; 60% T / 40% H; 20% Ma*	
Estrutura química		
Rendimento de síntese (η_{total})	%	87,65
Rendimento de síntese (η_{PU})	%	44,67
Umidade da partícula	%	Máx 10
Densidade relativa da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	1,1537
Densidade aparente da partícula	$g \cdot mL^{-1}$	0,5692
Ângulo de contato (água)	°	98,13
Tempo de absorção de 1 gota (água)	min	59
Área superficial	$m^2 \cdot g^{-1}$	87
Volume médio de poros	$mL \cdot g^{-1}$	0,22
Diâmetro médio de poros	nm	9,9
Grau de intumescimento	%	1,76
T_{onset} de decomposição	°C	418,1
T_{pico} de decomposição	°C	429,8
T_{endset} de decomposição	°C	443,1
Temperatura de transição vítrea (T_g)	°C	85,3
Atividade da CALB na HBM	$U \cdot g^{-1}$	540 ± 15
Atividade da CALB na EOE	$U \cdot g^{-1}$	183 ± 1

*M = monômeros, S = solventes (heptano+toluol), R = reticulante, E = estireno, T = toluol, H = heptano, Ma = magnetita

Fonte: Próprio autor

6 CONCLUSÕES

Os resultados sugerem que os copolímeros magnetizados obtidos no presente trabalho possuem potencial para aplicação como suporte para a imobilização de lipases, visto que apresentaram propriedades morfológicas, térmicas e magnéticas adequadas, além dos biocatalisadores, obtidos pela imobilização da lipase B de *Candida antarctica*, terem expressado atividades enzimáticas consideráveis. A partir dos estudos realizados foi possível verificar que:

- O rendimento total de polimerização foi favorecido quando todos os fatores foram empregados nos níveis mais elevados; já para a máxima obtenção em partículas úteis, as condições foram diferentes para cada copolímero, atingindo rendimentos superiores a 80%;
- A incorporação da magnetita nas matrizes poliméricas foi constatada pelas análises de EDX, FT-IR, Raman, ICP-OES, DRX e Histerese, na qual os espectros de FT-IR apresentaram bandas características de óxido de ferro, comprovado pelos espectros de DRX, como sendo magnetita (Fe_3O_4);
- A análise de FT-IR também comprovou a formação dos copolímeros, sendo observada a presença de bandas características do monômero base (STY) e de cada agente reticulante empregado;
- Por meio da análise de ICP-OES foi possível notar que em média, apenas 35 a 40% de toda a magnetita adicionada ao processo de síntese foi incorporada à matriz polimérica, sendo considerada ideal a adição de 20% de Fe_3O_4 para a magnetização dos copolímeros, fixando-se o fator D (% de magnetita em relação à massa total de monômeros) no nível 3.
- As análises de TGA e DSC atestaram que os copolímeros são estáveis termicamente, apresentando decomposição a temperaturas superiores a 300 °C e temperaturas de transição vítrea entre 84 e 85 °C;
- As micrografias (MEV e MOC) constataram que o agente iniciador promove alterações na morfologia do material, sendo as partículas sintetizadas com AIBN as mais adequadas, visto que apresentam-se mais esféricas e homogêneas;
- A partir das análises de BET pode-se perceber que tanto o agente reticulante como o iniciador influenciaram as propriedades texturais (rugosidade) das partículas poliméricas, destacando-se as sintetizadas com AIBN, visto que apresentaram maiores áreas superficiais e volumes de poros;

- Em relação a molhabilidade e grau de intumescimento, os copolímeros de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M mostraram-se os mais hidrofóbicos e com maior capacidade de absorção do solvente heptano, características importantes para o processo de imobilização de lipases;
- Dentre os biocatalisadores obtidos pela imobilização da lipase B de *Candida antarctica* nos diferentes copolímeros magnéticos, os constituídos pelos suportes de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M apresentaram os valores mais elevados de atividade catalítica, tanto na hidrólise do butirato de metila como na esterificação do oleato de etila;
- A estabilidade térmica dos derivados imobilizados que expressaram as melhores atividades enzimáticas (obtidos pelos suportes de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M) foi avaliada, sendo constatadas atividades residuais da ordem de 97% após incubação por 4 h a 50°C. A CALB imobilizada em STY-EGDMA-M demonstrou um tempo de meia-vida superior a 20 h, tornando-a cerca de 14 vezes mais estável que a enzima livre, comprovando o sucesso do processo de imobilização.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir dos resultados alcançados é possível vislumbrar a continuidade dos estudos para a aplicação de biocatalisadores obtidos a partir dos copolímeros magnéticos sintetizados no presente trabalho em diversas reações de síntese. Para esta finalidade, sugere-se:

- Estudar a síntese dos copolímeros utilizando BPO como agente iniciador, visto que os resultados atingidos e as características observadas da matriz polimérica podem ser melhorados;
- Avaliar o desempenho de biocatalisadores obtidos pela imobilização de outras lipases, como *Thermomyces lanuginosus* e *Penicillium camemberti* nos diferentes copolímeros sintetizados;
- Aplicar os biocatalisadores obtidos pela imobilização da lipase B de *Candida antarctica* nos suportes de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M na síntese de ésteres emolientes, como por exemplo: oleato de 2-etil-hexila, oleato de butila e oleato de cetila.
- Verificar a capacidade de adsorção do glicerol nas matrizes poliméricas de STY-EGDMA-M e STY-TEGDMA-M, visto que foram os suportes mais hidrofóbicos, visando avaliar sua adequação para aplicação na síntese de biodiesel a partir da transesterificação enzimática de óleos e gorduras.

REFERÊNCIAS

- ACHILIAS, D. S.; KARABELA, M. M.; SIDERIDOU, I. D. Thermal degradation and isoconversional kinetic analysis of light-cured dimethacrylate copolymers. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 99, n. 3, p. 917–923, 2010.
- ADLERCREUTZ, P. Immobilisation and application of lipases in organic media. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6406, 2013.
- AGUIAR, L. G. et al. Mathematical Modeling of NMRP of Styrene-Divinylbenzene over the Pre- and Post-Gelation Periods Including Cyclization. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 8, n. 4, p. 295–313, 2014.
- AL-ZUHAIR, S. Perspective: Jatropha cultivation in southern India: Assessing farmers' experiences. **Biofuels, Bioproducts and Biorefining**, v. 6, n. 3, p. 246–256, 2012.
- ALCÁZAR, Á. et al. Microencapsulation of TOMAC by suspension polymerisation: Process optimisation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 117, p. 1–10, 2017.
- AMORIM, R. V. S. et al. Chitosan from *Syncephalastrum racemosum* used as a film support for lipase immobilization. **Bioresource Technology**, v. 89, n. 1, p. 35–39, 2003.
- ANGELICA, M.; NEVES, S.; DIAS, M. L. Copolímeros de Estireno-Divinilbenzeno para Aplicação em Cromatografia de Exclusão por Tamanho. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 71–77, 1997.
- BABAKI, M. et al. Effect of water, organic solvent and adsorbent contents on production of biodiesel fuel from canola oil catalyzed by various lipases immobilized on epoxy-functionalized silica as low cost biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 1–20, 2015.
- BAHULEKAR, R.; AYYANGAR, N. R.; PONRATHNAM, S. Polyethyleneimine in immobilization of biocatalysts. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 13, n. 11, p. 858–868, 1991.
- BARSÉ, L. Q. et al. Production and optimization of isopropyl palmitate via biocatalytic route using home-made enzymatic catalysts. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 94, n. 2, p. 389–397, 2019.
- BASILIO, J. C. **ABIHPEC na Hair Brasil 2017: Brasileiros valorizam os cuidados pessoais e estão exigentes com as inovações do mercado**. 2017. Disponível em: <https://abihpec.org.br/2017/04/abihpec-na-hair-brasil-2017-brasileiros-valorizam-os-cuidados-pessoais-e-estao-exigentes-com-as-inovacoes-do-mercado/>. Acesso em: 3 mar. 2018a.
- BASILIO, J. C. **Mercado brasileiro de HPPC : quarta posição mundial com sensação de terceira**. 2017. Disponível em: <https://abihpec.org.br/2017/02/mercado-brasileiro-de-hppc-quarta-posicao-mundial-com-sensacao-de-terceira/>. Acesso em: 3 mar. 2018b.
- BASSI, J. J. et al. Interfacial activation of lipases on hydrophobic support and application in the synthesis of a lubricant ester. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 900–909, 2016.

BENTO, H. B. S. **Preparação e caracterização de biocatalisadores a partir de lipases imobilizadas em partículas magnetizadas de poli(estireno-co-divinilbenzeno)**. 2015. 94p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

BENTO, H. B. S. et al. Magnetized poly(STY-co-DVB) as a matrix for immobilizing microbial lipase to be used in biotransformation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 426, p. 95–101, 2017.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004.

BERNAL, C. et al. Influência de alguns parâmetros experimentais nos resultados de análises calorimétricas diferenciais - DSC. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 849–855, 2002.

BESTETI, M. D. et al. Core/shell polymer particles by semibatch combined suspension/emulsion polymerizations for enzyme immobilization. **Macromolecular Materials and Engineering**, v. 299, n. 2, p. 135–143, 2014.

BLAMEY, J. M. et al. Enzymatic Biocatalysis in Chemical Transformations: A Promising and Emerging Field in Green Chemistry Practice. In: **Biotechnology of Microbial Enzymes: Production, Biocatalysis and Industrial Applications**. Elsevier Inc., 2016. p. 347–403.

BOMMARIUS, A. S.; RIEBEL-BOMMARIUS, B. R. **Biocatalysis: Fundamentals and Applications**. Wiley-Blackwell, 2005.

BRANDT, T. H.; BRANDT, D. F.; NUNES, S. Uso do planejamento ortogonal de Taguchi para a melhoria de parâmetros de fresamento com ferramenta de metal duro. **Ling. Acadêmica**, v. 6, n. 1, p. 101–126, 2016.

BRUNAUER, S.; EMMETT, H. P.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 35, p. 309--319, 1938.

CALLISTER Jr., W. D.; RETHWISCH, D. G. **Ciência e engenharia dos materiais – uma Introdução**. 5ª ed. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos S.A., 2012. 817 p.

CAMILO, R. L. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de ferrita de cobalto recobertas por 3-aminopropiltriétoxissilano para uso como material híbrido em nanotecnologia**. 2006. 187 p. Tese (Doutorado) - INPEN, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

CANEVAROLO JR, S. V. **Ciência dos polímeros**. São Paulo: Editora Artliber, 2010. 280 p.

CANTONE, S. et al. Efficient immobilisation of industrial biocatalysts: criteria and constraints for the selection of organic polymeric carriers and immobilisation methods. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6262, 2013.

CARMIGNOLA, E. Tecnologia das enzimas em panificação. **Food Ingredients Brasil**, p. 34–36, 2017.

CARRAHER, C. E. Introduction to Polymer Chemistry,. **Journal of Chemical Education**, v. 58, n. 11, p. 528, 2010.

CARVALHO, C. F. **Caracterização Funcional e Estrutural de uma enzima Lipolítica encontrada na Biblioteca Metagenômica de Solo de Terra Preta de Índio**. 2015. 161 p. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2014.

CASAS, A.; RAMOS, M. J.; PÉREZ, Á. Production of biodiesel through interesterification of triglycerides with methyl acetate. **Nova Science Publishers, Inc.**, v. 1, p. 143–186, 2013.

CHAN, Y. H. et al. Studies on catalytic pyrolysis of empty fruit bunch (EFB) using Taguchi's L9 Orthogonal Array. **Journal of the Energy Institute**, v. 87, n. 3, p. 227–234, 2014.

CHAO, C. et al. Emollients for cosmetic formulations: Towards relationships between physico-chemical properties and sensory perceptions. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 536, p. 156–164, 2018.

CHIES, V. **Etanol 2G depende do aprimoramento de enzimas**. 2014. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/1917538/etanol-2g-depende-do-aprimoramento-de-enzimas#>. Acesso em: 20 mar. 2018.

COLLA, L. M.; REINEHR, C. O.; COSTA, J. A. V. Applications and Production of Microbial Lipases. **Revista CIATEC**, v. 4, n. 2, p. 1–14, 2012.

CONTI, R. DE; RODRIGUES, J. A. R.; MORAN, P. J. S. Biocatalysis: Recent Advances. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 672–675, 2001.

CRUZ JR, A. **Imobilização de Lipase de *Candida antarctica* B em Quitosana para Obtenção de Biodiesel por Transesterificação do Óleo de Mamona**. 2007. 122 p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2007.

CULLITY, B. D.; COHEN, M. **Elements of diffraction**. 2nd ed. Addison-Wesley Publishing Company Inc, 1978. 555 p.

CULLITY, B. D.; GHAHAM, C. D. **Introduction to magnetic materials**, 2nd ed. Weinheim: WILEY, 2009. 568 p.

CUNHA, A. G. et al. Preparation of core-shell polymer supports to immobilize lipase B from *Candida antarctica*: Effect of the support nature on catalytic properties. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 59–67, 2014.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DE CASTRO, H. F. et al. Modificação de óleos e gorduras por biotransformação. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 146–156, 2004.

DEKKER, R. F. H. Immobilization of a Lactase onto a Magnetic Support by Covalent Attachment to Polyethyleneimine- Glutaraldehyde-Activated Magnetite. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 22, p. 289–310, 1989.

DIZGE, N.; KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**, v. 32, p. 1274–1278, 2008.

DOBLE, M.; KRUTHIVENTI, A. K. Industrial Examples. In: **Green Chemistry and Engineering**. Cap. 9. 2006. p. 245–296.

DUPONT. **DuPont Industrial Biosciences**. 2014. Disponível em: <http://biosciences.dupont.com/industries/>. Acesso em: 23 mar. 2018.

EL GHANDOOR, H. et al. Synthesis and some physical properties of magnetite (Fe₃O₄) nanoparticles. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 7, n. 6, p. 5734–5745, 2012.

FAN, G. et al. Amberlyst 15 as a new and reusable catalyst for the conversion of cellulose into cellulose acetate. **Carbohydrate Polymers**, v. 112, p. 203–209, 2014.

FERNANDES, I. A. et al. Nanoparticles of poly(hydroxybutyrate- co -hydroxyvalerate) as support for the immobilization of *Candida antarctica* lipase (Fraction B). **Química Nova**, v. 37, n. 2, p. 331–336, 2014.

FIDALGO, W. R. R. **Produção enzimática de biodiesel em reator de leito fluidizado a partir da etanolise do óleo de babaçu: estabelecimento das condições reacionais e operacionais**. 2014. 158p. Tese (Doutorado) — Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

FORESTI, M. L. et al. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. **Applied Surface Science**, v. 256, n. 6, p. 1624–1635, 2010.

FRIED, J. R. Polymer Science and Technology, 2nd ed. **Journal of Chemical Education**, v. 81, n. 6, p. 809, 2003.

FUENTES, M. et al. Use of polyvalent cations to improve the adsorption strength between adsorbed enzymes and supports coated with dextran sulfate. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 332–336, 2006.

GAUTAM, R. K. et al. Removal of Ni(II) by magnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 204, p. 60–69, 2015.

GERVALD, A. Y.; GRITSKOVA, I. A.; PROKOPOV, N. I. Synthesis of magnetic polymeric microspheres. **Russian Chemical Reviews**, v. 79, n. 3, p. 219–229, 2010.

GONSALVES, A. DE A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.

GUISAN, J. M. **Immobilization of enzymes and cells**. Totowa: Humana Press, 2006. 449 p.

HALLING, P. J.; DUNNILL, P. Magnetic supports for immobilized enzymes and bioaffinity adsorbents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 2, n. 1, p. 2–10, 1980.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235–251, 2006.

HATTORI, M.; SUDOL, E. D.; EL-AASSER, M. S. Highly crosslinked polymer particles by dispersion polymerization. **Journal of applied polymer science**, v. 50, n. 11, p. 2027–2034, 1993.

IBGE. PNAD 2016: população idosa cresce 16,0% frente a 2012 e chega a 29,6 milhões.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, p. 6–10, 2017.

ILLANES, A. Immobilized Biocatalysts. In: **Comprehensive Biotechnology**. 2nd ed. Elsevier B.V., 2011. Cap. 1, p. 25 - 38.

IZQUIERDO, D. F. et al. Tuning lipase B from *Candida antarctica* C–C bond promiscuous activity by immobilization on poly-styrene-divinylbenzene beads. **RSC Advances**, v. 4, n. 12, p. 6219, 2014.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. **Trends in Biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396–403, 1998.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

JOSÉ, N. M.; SANCHEZ DE ALMEIDA PRADO, L. A. Materiais híbridos orgânico-inorgânicos: Preparação e algumas aplicações. **Química Nova**, v. 28, n. 2, p. 281–288, 2005.

JUDY-AZAR, A. R.; MOHEBBI, S. A novel magnetic hybrid nanomaterial as a highly efficient and selective catalyst for alcohol oxidation based on new Schiff base complexes of transition metal ions. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 397, p. 158–165, 2015.

LEE, Y.; RHO, J.; JUNG, B. Preparation of magnetic ion-exchange resins by the suspension polymerization of styrene with magnetite. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 89, n. 8, p. 2058–2067, 2002.

LI, S. et al. Technology Prospecting on Enzymes: Application, Marketing and Engineering. **Computational and Structural Biotechnology Journal**, v. 2, n. 3, p. 1–11, 2012.

LI, X. R.; WANG, X. L.; KOSEKI, H. Study on thermal decomposition characteristics of AIBN. **Journal of Hazardous Materials**, v. 159, n. 1, p. 13–18, 2008.

LIMA, R. M. et al. Versatility of *Candida antarctica* lipase in the amide bond formation applied in organic synthesis and biotechnological processes. **Journal of Molecular Catalysis B**, v. 466, p. 7–105, 2019.

LUCCHESI, A. M. et al. **Biocatálise e Biotransformação : Fundamentos e Aplicações**. Fortaleza. SCHOBA, 2012. 406 p.

MACHADO, F.; LIMA, E. L.; PINTO, J. C. Uma revisão sobre os processos de polimerização em suspensão. **Polímeros**, v. 17, n. 2, p. 166–179, 2007.

MÄKELÄ, M. Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review. **Energy Conversion and Management**, v. 151, p. 630–640, 2017.

MANO, B. M.; MENDES, L. C. **Introdução a polímeros**. Rio de Janeiro: Editora Blucher, 1999. 191p.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. 2009. 194 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, 2009.

MENDES, A. A.; DE CASTRO, H. F.; DE L.C. GIORDANO, R. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 245–251, 2013.

MIJONE, P. D.; **Imobilização de lipase em suporte magnetizado: desenvolvimento de técnicas de imobilização e aplicação na síntese de ésteres alquílicos**. 92 p. 2014. Dissertação (Mestrado Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2014.

MOHAMAD, N. R. et al. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. **Biotechnology and Biotechnological Equipment**, v. 29, n. 2, p. 205–220, 2015.

NARWAL, S. K.; GUPTA, R. Biodiesel production by transesterification using immobilized lipase. **Biotechnology Letters**, v. 35, n. 4, p. 479–490, 2013.

NIE, K. et al. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 43, n. 1–4, p. 142–147, 2006.

OKAY, O. Macroporous copolymer networks. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 25, n. 6, p. 711–779, 2000.

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: Uma revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 123–130, 2013.

ORÇAIRE, O.; BUISSON, P.; PIERRE, A. C. Application of silica aerogel encapsulated lipases in the synthesis of biodiesel by transesterification reactions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 3–4, p. 106–113, 2006.

PALMER, T.; BONNER, P. L. An Introduction to Enzymes. In: **Enzymes**. Elsevier Science, 2011a. Cap. 4, p. 2–13.

PALMER, T.; BONNER, P. L. Applications of Enzymatic Analysis in Medicine, Forensic Science and Industry. In: **Enzymes**. Elsevier Science, 2011b. Cap. 19, p. 343–355.

PANIGRAHI, R.; SRIVASTAVA, S. K. Trapping of microwave radiation in hollow polypyrrole microsphere through enhanced internal reflection: A novel approach. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 7638, 2015.

PATEL, B. **Commercial applications of enzymes**. 2014. Disponível em: <http://www.sciencenutshell.com/commercial-applications-enzymes/>. Acesso em: 2 abr. 2018

PELLIS, A. et al. Evolving biocatalysis to meet bioeconomy challenges and opportunities. **New Biotechnology**, v. 40, p. 154–169, 2018.

PEREIRA, R. M. **Técnicas de imobilização e estabilização de lipases obtidas a partir de diferentes fontes microbianas**. 2014. 31 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Engenharia Biotecnológica). Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2014.

PHILLIPS, T. **Enzyme Biotechnology in Everyday Life**. 2017. Disponível em: <https://www.thebalance.com/enzyme-biotechnology-in-everyday-life-375750>. Acesso em: 2 abr. 2018

PIETERS, B. R.; BARDELETTI, G. Enzyme immobilization on a low-cost magnetic support: Kinetic studies on immobilized and coimmobilized glucose oxidase and glucoamylase. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 14, n. 5, p. 361–370, 1992.

POLSHETTIWAR, V. et al. Magnetically recoverable nanocatalysts. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 5, p. 3036–3075, 2011.

PRAZERES, D. M. F.; GARCIA, F. A. P.; CABRAL, J. M. S. An ultrafiltration membrane bioreactor for the lipolysis of olive oil in reversed micellar media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 41, n. 8, p. 761–770, 1993.

PREMARATNE, W. A. P. J. et al. Synthesis of Nanosilica from Paddy Husk Ash and Their Surface Functionalization. **Journal of Science of the University of Kelaniya Sri Lanka**, v. 8, p. 33–48, 2014.

PRENNER, E.; CHIU, M. Differential scanning calorimetry: An invaluable tool for a detailed thermodynamic characterization of macromolecules and their interactions. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 3, n. 1, p. 39, 2011.

PRLAINOVIĆ, N. Ž. et al. Surface functionalization of oxidized multi-walled carbon nanotubes: *Candida rugosa* lipase immobilization. **Comptes Rendus Chimie**, v. 19, n. 3, p. 363–370, 2016.

QUILLES JR, J. C. **Imobilização de enzimas e células**. 2017. Disponível em: <https://www.portaleducacao.com.br/conteudo/artigos/direito/imobilizacao-de-enzimas-e-celulas/55930>. Acesso em: 26 mar 2018.

REN, Y. et al. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. **BMC Biotechnol.**, v.11, p.63, 2011.

ROBINSON, P. J.; DUNNILL, P.; LILLY, M. D. The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 15, n. 3, p. 603–606, 1973.

RODELLA, C. B. **Preparação e Caracterização de Catalisadores de V2O5 Suportados em TiO₂**. 2001. 134 p. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Carlos, 2001.

RODRIGUES, R. C. et al. Two step ethanolysis: A simple and efficient way to improve the enzymatic biodiesel synthesis catalyzed by an immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 8, p. 1268–1273, 2010.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization of lipases on hydrophobic supports: immobilization mechanism, advantages, problems, and solutions. **Biotechnology Advances**, p. 119, 2019.

ROYVARAN, M. et al. Functionalized superparamagnetic graphene oxide nanosheet in enzyme engineering: A highly dispersive, stable and robust biocatalyst. **Chemical Engineering Journal**, v. 288, p. 414–422, 2016.

RUSIANTOA, T. et al. Various sizes of the synthesized Fe₃O₄ nanoparticles assisted by mechanical vibrations. **Indian Journal of Engineering & Materials Sciences**, v. 22, p. 175–180, 2015.

SAIBI, W. et al. Biocatalysts: Beautiful creatures. **Biochemical and Biophysical Research**

Communications, v. 426, n. 3, p. 289–293, 2012.

SANTOS, K. P. et al. Produção da enzima alfa-acetolactato descarboxilase por fermentação microbiana: análise da eficiência de etapas de pré-purificação do extrato enzimático. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, 21., 2016. **Anais...** Fortaleza. 2016.

SANTOS, V. N. **Estudo cinético da copolimerização estireno-divinilbenzeno**. 2015. 124 p. Dissertação (Mestrado) - Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

SARANYA, T. et al. XRD , FT-IR and SEM Study of Magnetite (Fe₃O₄) Nanoparticles Prepared by Hydrothermal Method. **International Research Journal of Nano Science & Technology**, v. 5, n. 4–6, p. 149–154, 2015.

SEARS, W. M.; HUNT, J. L.; STEVENS, J. R. Raman scattering from polymerizing styrene . I. Vibrational mode analysis. **The Journal of Chemical Physics**, v. 75, p. 1589–1598, 1981.

SHAH, S.; GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**, v. 42, n. 3, p. 409–414, 2007.

SHEBANOVA, O. N.; LAZOR, P. Raman spectroscopic study of magnetite (FeFe₂O₄): A new assignment for the vibrational spectrum. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 174, n. 2, p. 424–430, 2003.

SHELDON, R. A. The E Factor: fifteen years on. **Green Chemistry**, v. 9, n. 12, p. 1273–1283, 2007.

SHIM, S. E. et al. Fully crosslinked poly(styrene-co-divinylbenzene) microspheres by precipitation polymerization and their superior thermal properties. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 835–845, 2004.

SILVA, M. V. C. **Síntese do palmitato de isopropila catalisada por lipase imobilizada em copolímero magnetizado**. 2017. 117p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2017.

SILVA, M. V. C. et al. Caracterização das propriedades da lipase de pseudomonas fluorescens imobilizada em matriz polimérica híbrida magnetizada. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA – COBEQ, 21., 2016. **Anais...** Fortaleza. 2016.

SILVA, M. V. C. et al. Magnetized poly (styrene-co-divinylbenzene) particles synthesis for use as immobilization matrix of lipase. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE BIOPROCESSOS, 21., SIMPÓSIO DE HIDRÓLISE ENZIMÁTICA DE BIOMASSA, 12., 2017. **Anais...** Aracaju, Sergipe. 2017. p. 1–4, 2017.

SILVA, M. V. C. et al. Isopropyl myristate continuous synthesis in a packed-bed reactor using lipase immobilized on magnetic polymer matrix. **International Journal of Engineering Research & Science**, v. 4, n. 10, p. 12–20, 2018a.

SILVA, M. V. C. et al. Optimization of the parameters that affect the synthesis of magnetic copolymer styrene-divinylbenzene to be used as efficient matrix for immobilizing lipases. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 11, p. 1–12, 2018b.

SIMÕES, A. S. et al. Desempenho da matriz híbrida SIO₂ -quitosana na imobilização da

lipase microbiana de *Candida rugosa*. **Química Nova**, v. 34, n. 1, p. 33–38, 2011.

SMITH, A. L. . Characteristic absorption frequencies. In: **Applied Infrared spectroscopy**. New York: Wiley & Sons, 1979. Appendix 2, p. 286–315.

SOUTO-MAIOR, J. P. A. et al. Avaliação da pectina fosfatada aplicada na formação de filmes isolados: Material candidato a novos sistemas para liberação modificada de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 203–213, 2008.

SOUZA, L. T. DE A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suporte. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. 4 ed. Blucher, 2017. Cap 5, p. 529–568.

SVENDSEN, A. **Understanding Enzymes: Function, Design, Engineering, and Analysis**. CRC Press. 1st ed. 2016. 700 p.

SWANSON, H. E. et al. Standard X-ray diffraction - Powder patterns. In: **National Bureau of Standards**. Library of ed. Washington, D.C.: Government Printing Office, 1967. 90 p.

TANASKOVIĆ, S. J. et al. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on kaolin and its application in synthesis of lipophilic antioxidants. **Applied Clay Science**, v. 135, p. 103–111, 2017.

TEIXEIRA, P. C. et al. Densidade de partículas. In: **Manual de Métodos de Análise de Solo**. 3 ed. Brasília, 2017. Cap. 8, 1 - 8 p.

TERESCENCO, D. et al. Influence of the emollient structure on the properties of cosmetic emulsion containing lamellar liquid crystals. **Colloids and Surfaces A journal**, v. 536, p. 10–19, 2018.

THEODORO, R. T. **Modificação química de resinas à base de estireno através do processo de sulfonação: estudo experimental e modelagem matemática**. 2018. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2018.

UHL, F. M. et al. Thermal stability of cross-linked polymers: Methyl methacrylate with divinylbenzene and styrene with dimethacrylates. **Polymer Degradation and Stability**, v. 71, n. 2, p. 317–325, 2001.

VALENZUELA, R. et al. Influence of stirring velocity on the synthesis of magnetite nanoparticles (Fe_3O_4) by the co-precipitation method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 488, n. 1, p. 227–231, 2009.

VENDITTI, I. et al. *Candida rugosa* lipase immobilization on hydrophilic charged gold nanoparticles as promising biocatalysts: Activity and stability investigations. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 131, p. 93–101, 2015.

VILLENEUVE, P. et al. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 9, n. 4–6, p. 113–148, 2000.

WAGNER, J. R.; MOUNT, E. M.; GILES, H. F. Polymer Overview and Definitions. **Extrusion**, p. 209–224, 2014.

WANG, X. et al. Raman hyperspectral image analysis of benzoyl peroxide additive. **Journal of Molecular Structure**, v. 1138, p. 6–11, 2017.

WILSON, L. et al. Effect of lipase-lipase interactions in the activity, stability and specificity of a lipase from *Alcaligenes* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 259–264, 2006.

WONG, H.; SCHOTZ, M. C. The lipase gene family. **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 7, p. 993–999, 2002.

XIANSHENG, N. et al. The use of Taguchi method to optimize the laser welding of sealing neuro-stimulator. **Optics and Lasers in Engineering**, v. 49, n. 3, p. 297–304, 2011.

YAGIZ, F.; KAZAN, D.; AKIN, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. **Chemical Engineering Journal**, v. 134, n. 1–3, p. 262–267, 2007.

YAN, F.; TEXTER, J. Reversibly Porating Coatings. In: SMART COATINGS, 1., 2007. **Anais...** Orlando, p. 72–87, 2007.

ZANIN, G. M.; MORAES, F, F. Enzimas imobilizadas. In: **Enzimas como agentes biotecnológicos**. Ribeirão Preto. Legis Summa, 2014. Cap.4, p.41-84.

ZHANG, B. et al. Enzyme immobilization for biodiesel production. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 93, n. 1, p. 61–70, 2012.

ZHAO, F.; ZHANG, B.; FENG, L. Preparation and magnetic properties of magnetite nanoparticles. **Materials Letters**, v. 68, n. 01, p. 112–114, 2012.

ZHU, L. et al. Autophagy in resin monomer-initiated toxicity of dental mesenchymal cells: a novel therapeutic target of N-acetyl cysteine. **J. Mater. Chem. B**, v. 3, n. 33, p. 6820–6836, 2015.