

Sibele Recco Rosso Comim

**PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLI( $\epsilon$ -CAPROLACTONA)  
EM FLUIDOS PRESSURIZADOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia de alimentos.

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

Coorientador: Prof. Dr. José Vladimir de Oliveira

Florianópolis

2012



*Dedico este trabalho à minha família.*



## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pela constante presença em minha vida.  
Aos meus pais Ascendino e Maria Terezinha por me destinarem tanto do seu tempo e de suas orações e por serem pessoas tão merecedoras do meu amor e de minha admiração.

Ao meu marido, Valmor Comim Junior, pelo amor e compreensão.  
A todos que fazem parte da minha família por terem me proporcionado o sentimento de pertencer a algo que realmente vale à pena.

Aos orientadores Sandra Regina Salvador Ferreira e José Vladimir de Oliveira por terem aceitado percorrer comigo esta jornada com compreensão, paciência e dedicação, e principalmente pela amizade que foi cultivada durante todos esses anos. São poucos os que têm o privilégio de cultivar tamanha admiração por seus orientadores.

À Prof.<sup>a</sup> Débora de Oliveira pelas orientações técnicas.

Ao colega Emanuel Bianchin pelas noites sem dormir cuidando de experimentos.

Ao estagiário de iniciação científica Marcos de Oliveira pela ajuda.

Aos amigos do LATESC (Florianópolis) e do Laboratório de Termodinâmica (Erechim) pelo convívio e amizade.

A CAPES, à FAPESC e ao CNPq pelo apoio financeiro.

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

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desta tese.



## RESUMO

A necessidade de se desenvolver processos limpos que possibilitem a obtenção de produtos livres de resíduos tóxicos, tanto para aplicação na área farmacêutica quanto alimentícia, possibilitou que processos de polimerização mediados por enzimas em fluidos pressurizados se tornassem atrativos. A policaprolactona (PCL) é um polímero biocompatível, biodegradável e bioreabsorvível, com aplicações nas indústrias alimentícia, farmacêutica e biomédica. Sendo assim, este trabalho objetiva estudar a produção de policaprolactona pelo mecanismo de abertura do anel da  $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL) por via enzimática em fluidos pressurizados visando a definição das melhores condições para a reação de polimerização. Para tal, foram realizados experimentos em dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) e gás liquefeito de petróleo (GLP), avaliando-se a influência da pressão de operação (120-280 bar), da razão solvente/monômero (razão mássica 2:1-1:2) e da porcentagem de enzima (5-15%) com relação ao monômero sobre o rendimento de reação, massa molecular numérica média ( $M_n$ ), massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) e índice de polidispersão (IP). O uso de um reator de volume variável permitiu a avaliação independente da pressão e da razão solvente/monômero. Os resultados destes experimentos foram utilizados para definir as condições para obtenção das cinéticas de polimerização. As cinéticas foram realizadas avaliando-se a influência da porcentagem de enzima (1%, 3%, 5% e 15%) e da temperatura (50°C e 60°C) nas reações em  $\text{CO}_2$  e a influência da porcentagem de enzima (3% e 5%) e da pressão (25 bar, 50 bar e 120 bar) nas reações em GLP. Os polímeros obtidos nas reações que compõem as cinéticas de polimerização foram avaliados em termos de rendimento de reação,  $M_n$ ,  $M_w$ , IP, produtividade, temperatura de fusão ( $T_m$ ) e grau de cristalinidade ( $X_c$ ). Este estudo também avaliou a possibilidade de reúso da enzima para diminuição do impacto do custo da enzima sobre o custo do processo. Os resultados obtidos por análise estatística ANOVA mostraram que a pressão não é uma variável significativa para nenhum das variáveis de processo selecionadas. Além disso, para o  $\text{CO}_2$ , os melhores resultados para rendimento,  $M_n$  e  $M_w$  foram obtidos para a razão de solvente/monômero de 1:2, enquanto para o GLP a razão solvente/monômero 2:1 proporciona melhores resultados. Como esperado, o aumento da porcentagem de enzima resultou em aumento do rendimento para ambos os solventes. Para o  $\text{CO}_2$  houve também

aumento de  $M_n$ ,  $M_w$  e IP. Nas cinéticas de reação foram obtidos rendimento de até 90%,  $M_n$  de até 13.700 Da e  $M_w$  de até 22.200 Da, para o  $\text{CO}_2$  com 15% de enzima e rendimento de até 81%,  $M_n$  de até 15.000 da e  $M_w$  de até 23.000 Da para o GLP com 5% de enzima. Os índices de polidispersão variaram de 1,2 a 1,7. Levando-se em consideração os cálculos de produtividade as condições escolhidas para realização dos ensaios de reúso foram 120 bar, razão solvente/monômero de 1:2, 3 % de enzima, 65°C e 12 horas de reação para o  $\text{CO}_2$  e 25 bar, razão solvente/monômero de 2:1, 3 % de enzima, 65°C e 8 horas de reação para o GLP. Quando se aplicou a enzima em ciclos de reúso, observou-se uma diminuição abrupta dos rendimentos para o  $\text{CO}_2$  devido ao seu efeito deletério sobre a atividade da enzima. Para o GLP esta diminuição foi progressiva. As massas moleculares obtidas apresentaram redução a cada ciclo. Na comparação dos resultados de rendimento, massa molecular e produtividade dos polímeros obtidos com o uso de  $\text{CO}_2$ , GLP e sem o uso de solvente, o GLP é a opção que mais se destaca devido aos bons resultados obtidos. Além disso, apresenta custo inferior e pressão de operação mais amena do que com o uso de  $\text{CO}_2$ . O uso do GLP, um solvente previamente não abordado pela literatura na produção de poliésteres, e o aspecto inovador da utilização de um reator de volume variável que permite a análise independente da influência da pressão, temperatura e da razão solvente/monômero são os diferenciais deste trabalho.

**Palavras-chave:** polimerização,  $\epsilon$ -caprolactona, Novozym 435, dióxido de carbono, gás liquefeito de petróleo.

## ABSTRACT

Lipase catalyzed polymerizations in pressurized fluids are becoming more attractive due to the need for development of cleaner processes able to yield products free of residues for pharmaceutical and food applications. Polycaprolactone is a biocompatible, biodegradable and bioresorbable polymer, is applied in a wide variety of structures for use in biomedical, food and pharmaceutical industries. Therefore, this thesis aims to study the enzymatic production of polycaprolactone using pressurized fluids as solvents in order to define the best conditions for the polymerization reaction. For this purpose, experiments were performed to evaluate the influence of the operating pressure (120-280 bar), the solvent/monomer mass ratio (2:1-1:2) and the percentage of enzyme related to monomer (5-15%) over the reaction yield, number-average molecular weight ( $M_n$ ), weight-average molecular weight ( $M_w$ ) and polydispersity index (PI) using liquefied petroleum gas (LPG) and carbon dioxide ( $CO_2$ ) as solvents. The use of a variable-volume reactor allowed an independent evaluation of pressure and solvent/monomer ratio. Results from these experiments defined the conditions for carrying out the polymerization kinetics. The kinetics assays were performed by assessing the influence of the percentage of enzyme (1%, 3%, 5% and 15%) and temperature (50 ° C and 60 ° C) in the  $CO_2$  reactions, and the influence of the percentage of enzyme (3 % and 5%) and pressure (25 bar, 50 bar and 120 bar) in the LPG reactions. Kinetic samples were evaluated by means of reaction yield,  $M_n$ ,  $M_w$ , PI, productivity, melting temperature and crystallinity degree. In order to reduce the impact of enzyme cost over overall process cost, the possibility of enzyme reuse was also studied. The results for ANOVA analysis showed that pressure is not a significant variable for any of the selected parameters. Regarding solvent/monomer ratio, best results for yield,  $M_n$  and  $M_w$  for  $CO_2$  reactions were obtained for the solvent/monomer ratio of 1:2, whereas for LPG the solvent/monomer ratio of 2:1 provided the optimum results. Increasing the percentage of enzyme resulted in yield increase, higher molecular mass and higher polydispersity indexes. Reaction kinetics was performed using different percentages of enzyme and temperatures. Reaction yields up to 90%,  $M_n$  up to 13,700 Da and  $M_w$  of up to 22,200 Da were obtained for  $CO_2$  using 15 wt% enzyme. Reaction yields up to 81%,  $M_n$  up to 15,000 Da and  $M_w$  of up to 23,000 Da were obtained for LPG using 5 wt% of enzyme. The polydispersity

index varied from 1.2 to 1.7. Taking into account the productivity calculations, the conditions chosen to perform the reuse assays were 120 bar, solvent/monomer ratio of 1:2, 3 wt% of enzyme, 65°C and 12 hours of reaction for CO<sub>2</sub> assays and 25 bar, solvent/monomer ratio of 2:1, 3 wt% of enzyme, 65°C and 8 hours of reaction for LPG assays. When the enzyme was applied in reuse cycles, it showed a sharp decrease in reaction yields for CO<sub>2</sub> assays probably due to its deleterious effect on the enzyme activity. For LPG the reaction yield decrease was progressive. The molecular masses obtained decreased with each cycle for both solvents. Comparing the results of yield, productivity and molecular mass of polymers obtained with the use of CO<sub>2</sub>, LPG and without the use of solvent, LPG is the option that stands out because of the good results obtained. Moreover, it has lower cost and milder operating pressure when compared to the use of CO<sub>2</sub>. The use of LPG, a solvent not previously reported in the production of polyesters and the innovative aspect of using a variable-volume reactor which allows independent analysis of the influence of pressure, temperature and the solvent/ monomer ratio are the highlights of this work.

**Keywords:** polymerization,  $\epsilon$ -caprolactone, Novozym 435, carbon dioxide, liquefied petroleum gas.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono/ <i>Carbon dioxide</i>
CALB	Lipase da <i>Candida antarctica</i> – fração B
CPEA	Cadeia polimérica enzima ativada
DP	<i>Degree of polymerization</i>
DSC	<i>Differential Scanning Calorimetry</i>
e-ROP	<i>Enzymatic ring-opening polymerization</i>
ε-CL	ε-caprolactona/ <i>ε-caprolactone</i>
FDA	<i>Food and drug administration</i>
GLP	Gás liquefeito de petróleo
GP	Grau de polimerização
GPC	<i>Gel permeation chromatography</i>
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
IP	Índice de polidispersão
LPG	<i>Liquefied petroleum gás</i>
M	Massa de enzima utilizada na reação (g)
MEA	Monômero-enzima ativado
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
M <sub>i</sub>	Massa molecular média da faixa de tamanho i
M <sub>n</sub>	Massa molecular numérica média/ <i>number-average molecular weight</i> (Da)
m <sub>u</sub>	Massa molecular da unidade repetitiva (Da)
M <sub>w</sub>	Massa molecular ponderal média/ <i>weight-average molecular weight</i> (Da)
P	Pressão/ <i>pressure</i> (bar)
PCL	Policaprolactona/ <i>polycaprolactone</i>
R	Rendimento (massa polímero/massa de monômero) (%)
RID	<i>Refractive Index Detector</i>
scCO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono supercrítico/ <i>supercritical carbon dioxide</i>
SEC	<i>Size-Exclusion Chromatography</i>
SEM	<i>Scanning Electronic Microscopy</i>
S/M	<i>Solvent/ monomer ratio</i>
T	Tempo de reação/ <i>reaction time</i> (min)
T <sub>g</sub>	Temperatura de transição vítrea/ <i>glass transition temperature</i> (°C)
THF	Tetrahidrofurano/ <i>tetrahydrofuran</i>
T <sub>m</sub>	Temperatura de fusão/ <i>melting temperature</i> (°C)

ty	Tempo de máxima velocidade de rendimento/ <i>maximum yield rate time</i> (h)
tp	Tempo de máxima velocidade de produtividade/ <i>maximum productivity rate time</i> (h)
$w_i$	Fração em massa das moléculas na faixa de tamanho i
$x_i$	Fração em número das moléculas na faixa de tamanho i
$\bar{X}_c$	Grau de cristalinidade/ <i>crystallinity degree</i> (%)
Y	<i>Yield</i> ( <i>polymer mass/ monomer mass</i> )
YR	Velocidade de rendimento/ <i>yield rate</i> (wt%.h <sup>-1</sup> )
YP	Velocidade de produtividade/ <i>productivity rate</i> (wt%.h <sup>-1</sup> )
$\rho$	<i>Density</i> (g/cm <sup>3</sup> )
[E]	<i>Enzyme porcentage</i> ( <i>enzyme mass/ monomer mass</i> )

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO .....	25
1.1 OBJETIVOS .....	28
1.1.1 Objetivo Geral .....	28
1.1.2 Objetivos Específicos .....	28
1.2. ESTRUTURA DO DOCUMENTO.....	29
1.3 REFERÊNCIAS.....	30
CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	35
2.1 POLÍMEROS.....	35
2.1.1 Massa molecular e sua distribuição.....	35
2.1.2 Policaprolactona .....	38
2.2 ENZIMAS.....	42
2.3. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO .....	43
2.3.1 Mecanismo da polimerização por abertura do anel .....	44
2.3.2 Uso de fluidos pressurizados na polimerização.....	50
2.3.3 Polimerização enzimática envolvendo fluidos pressurizados .....	53
2.3.4 Reatores.....	57
2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE.....	58
2.5 REFERÊNCIAS.....	60
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
3.1 MATERIAIS.....	73
3.2 REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO: APARATO EXPERIMENTAL.....	74
3.3 POLIMERIZAÇÃO A ALTA PRESSÃO: PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	79
3.4 ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA PRESSÃO, RAZÃO SOLVENTE/MONÔMERO E TEOR DE ENZIMA.....	81
3.5 CINÉTICAS DE POLIMERIZAÇÃO.....	84

3.6 REÚSO DA ENZIMA.....	86
3.7 POLIMERIZAÇÃO SEM USO DE SOLVENTE A BAIXA PRESSÃO .....	86
3.8 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA DE PERMEAÇÃO EM GEL (GPC).....	88
3.9 CÁLCULO DA PRODUTIVIDADE DA REAÇÃO .....	89
3.10 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA.....	89
3.11 ANÁLISE POR CALORIMETRIA EXPLORATÓRIA DE VARREDURA DIFERENCIAL (DSC).....	91
3.12 CÁLCULO DAS VELOCIDADES DE REAÇÃO.....	91
3.13 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	92
3.14 REFERÊNCIAS .....	93
<b>CAPÍTULO 4: POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA USANDO CO<sub>2</sub> COMO SOLVENTE.....</b>	<b>97</b>
4.1 RESULTADOS PRELIMINARES .....	98
4.1.1 Seleção da enzima.....	98
4.1.2 Atividade enzimática da Novozym 435 em uma cinética de polimerização de ε-caprolactona em dióxido de carbono supercrítico.....	100
4.2 ARTIGO SUBMETIDO À THE JOURNAL OF SUPERCRITICAL FLUIDS: ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLY(ε-CAPROLACTONE) IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE MEDIUM BY MEANS OF A VARIABLE-VOLUME VIEW REACTOR. ....	103
4.2.1. Introduction.....	104
4.2.2. Experimental.....	105
4.2.3. Results and discussion .....	111
4.2.4. Conclusions.....	129
4.2.5 Acknowledgments.....	130
4.3 REFERENCES .....	130

CAPÍTULO 5: POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA USANDO GLP  
COMO SOLVENTE ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.1 ENZYMATIC SYNTHESIS OF POLY( $\epsilon$ -CAPROLACTONE)  
IN LIQUIFIED PETROLEUM GAS (LPG) **Erro! Indicador não  
definido.**

5.1.1 Introduction ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.1.2. Experimental ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.1.3. Results and discussion..... **Erro! Indicador não definido.**

5.1.4. Conclusions ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.1.5 Acknowledgments ..... **Erro! Indicador não definido.**

5.2 REFERENCES ..... **Erro! Indicador não definido.**

CAPÍTULO 6: POLIMERIZAÇÃO ENZIMÁTICA SEM SOLVENTE  
A BAIXA PRESSÃO ..... **Erro! Indicador não definido.**

6.1 COMPARAÇÃO ENTRE OS RESULTADOS OBTIDOS PARA  
A PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLICAPROLACTONA EM  
CO<sub>2</sub>, EM GLP E EM AUSÊNCIA DE SOLVENTE **Erro! Indicador  
não definido.**

6.2 REFERÊNCIAS..... **Erro! Indicador não definido.**

CAPÍTULO 7: CONCLUSÕES ..... **Erro! Indicador não definido.**

7.1 SUGESTÕES DE TRABALHOS FUTURO **Erro! Indicador  
não definido.**

APÊNDICE I – PROJETO ESTRUTURA DA UNIDADE DE  
REAÇÃO ..... 137

I.I PROJETO DA ESTRUTURA PARA ABRIGAR REATOR,  
VÁLVULAS, TUBULAÇÕES E INDICADORES ..... 137

I.II REFERÊNCIAS..... 140

APÊNDICE II – CÁLCULO ESPESSURA DO REATOR ..... 141

II.I. CÁLCULO DA ESPESSURA MÍNIMA E DA PRESSÃO  
MÁXIMA INTERNA DO REATOR ..... 141

II.II REFERÊNCIAS ..... 142

APÊNDICE III - PROJETO DO REATOR ..... 143

APÊNDICE IV - RESULTADOS PARA O AJUSTE PROC NLIN .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
APÊNDICE V – GRÁFICOS DE PARETO.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
V.I GRÁFICOS DE PARETO PARAS AS REAÇÕES EM CO <sub>2</sub> (CAPÍTULO 5).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
V.II GRÁFICOS DE PARETO PARAS AS REAÇÕES EM GLP (CAPÍTULO 6).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
APÊNDICE VI – LISTA DE PUBLICAÇÕES.....	151

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Estrutura química da $\epsilon$ -caprolactona e poli( $\epsilon$ -caprolactona). (a) $\epsilon$ -caprolactona na sua forma cíclica, anel de sete membros com fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$ . (b) Unidade monomérica repetitiva da poli( $\epsilon$ -caprolactona), $\epsilon$ -caprolactona com o anel aberto. ....	39
Figura 2.2 - Parte do osso fêmur (1) e scaffold customizado (2).....	40
Figura 2.3 – Mecanismo de transesterificação enzimática. ....	45
Figura 2.4 - Mecanismo de polimerização em etapas de lactonas cíclicas por abertura de anel tendo como iniciador a água. ....	47
Figura 2.5 - Reações de transesterificação possíveis em um processo de polimerização de abertura de anel catalisada por lipase. Os números referem-se ao grupo carboxílico que é ativado pela enzima, as letras se referem ao grupo nucleofílico. ....	48
Figura 2.6 - Representação gráfica da variação da densidade do $CO_2$ puro.....	52
Figura 2.7 - Micrografias eletrônicas de varredura de Novozym 435: (a) amplificação de 50 vezes, (b) amplificação de 200 vezes, (c) amplificação de 2000 vezes e (d) amplificação de 10.000 vezes. Da esquerda para a direita, Micrografias eletrônicas referentes à enzima não tratada, tratadas em butano e em dióxido de carbono, respectivamente. Nos dois últimos casos as condições são: temperatura de 75°C, tempo de 6 horas, densidade reduzida de 1,6 e pressão de 276,4 bar. Fonte: Oliveira et al (2006). ....	56
Figura 3.1 - Fluxograma apresentando os materiais, as etapas do trabalho e as respostas avaliadas. ....	71
Figura 3.2- Esquema do aparato experimental utilizado nas reações de polimerização. Adaptado de LANZA (2004). ....	75
Figura 3.3- Vista geral da unidade de reação utilizada para a produção de policaprolactona e seus equipamentos: 1) C1: reservatório de solvente, 2) BR1: banho termostático, 3) estrutura da unidade de reação, 4) reator, 5) AM: agitador magnético, 6) BS: bomba de seringa, 7) BR2: banho termostático ....	75
Figura 3.4 - Reator: (A) perspectiva; (B) perspectiva – corte interno. .	77
Figura 3.5 - Foto do reator e seus componentes: 1-2: tubulações para circulação de água, 3: tampa lateral da janela para entrada de luz, 4: conexão para alimentação de solvente, 5: conexão para entrada do termopar, 6: conexão extra, 7: tampa frontal, 8: tampa do fundo, 9:	

pistão, 10: anel de vedação suporte para a janela de safira frontal, 8: janela de safira, 11: anel de vedação da tampa de fundo, 12: anel de cobre, base para a tampa frontal.....77

Figura 3. 6- Pistão montado e seus componentes. Fonte: Lanza (2004). .....78

Figura 3. 7- Posicionamento da janela de safira frontal no reator.....78

Figura 4.1 - Atividade Residual da enzima para a cinética de polimerização a 120 bar, 5% de enzima, razão solvente:monômero 1:2, temperatura de 65°C ao longo de 20 horas.....101

Figure 4.2.2 - Reaction yield kinetic results for  $\epsilon$ -caprolactone polymerization at 120 bar, 1:2 solvent/monomer ratio with 1, 3, 5 and 15 wt% enzyme at 65 °C and 3 wt% of enzyme at 50 °C. .... 116

Figure 4.2.3 - Photographs of polymerization reactions at 120 bar, 5 wt% enzyme, 65°C, solvent to monomer ratio of 1:2 at several times: a) 1 h, b) 11 h, c) 20 h. ....117

Figure 4.2.4 - Numerical-average molecular weight kinetic results for  $\epsilon$ -caprolactone polymerization at 120 bar, 1:2 solvent to monomer ratio with 1, 3, 5 and 15 wt% of enzyme at 65 °C.....119

Figure 4.2.5 - Weight-average molecular weight kinetic results for  $\epsilon$ -caprolactone polymerization at 120 bar, 1:2 solvent/monomer ratio with 1, 3, 5 and 15 wt% of enzyme at 65 °C.....120

Figure 4.2.6 - Polycaprolactone samples obtained at 65°C, solvent/monomer ratio of 1:2 and 4 h for the enzyme contents of: A) 1%, B) 3%, C) 5%, D) 15%. ....121

Figure 4.2.7 - Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) samples obtained at 65°C, solvent/monomer ratio of 1:2 and enzyme content of 3 wt% and 120 bar for reaction times of: A) 2 h, B) 8 h, C) 12 h, D) 20 h. ....122

Figure 5.1 - LPG reactions performed with 15 wt% enzyme at 65°C, 280 bar for: 2:1 solvent/monomer mass ratio at time zero (A) and 1:2 solvent/monomer mass ratio at 2 hours of reaction (B). The turbidity presented by the systems is the produced polymer plasticized and presence of enzyme. Picture B is darkened because the turbidity does not allow the light to enter trough the lateral window.**Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.2 - Reaction yield results for the kinetic assays of  $\epsilon$ -caprolactone polymerization in LPG at 65 °C, 2:1 solvent/monomer ratio with: 3 wt% of enzyme at 25 bar and at 50 bar and with 5 wt% of enzyme at 50 bar and at 120 bar..... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.3 - Comparison between yield results obtained for LPG at 120 bar, 65 °C, 5 wt% of enzyme, 2:1 solvent/monomer ratio and results obtained for CO<sub>2</sub> at 120 bar, 65 °C, 5 wt% of enzyme, 1:2 solvent/monomer ratio. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.4 - Numerical-average molecular weight kinetic results for ε-caprolactone polymerization at 65 °C, 2:1 solvent/monomer ratio with 3 wt% of enzyme at 25 bar and 50 bar and with 5 wt% enzyme at 25 bar and 50 bar and 120 bar. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.5 - Weight-average molecular weight kinetic results for ε-caprolactone polymerization at 65 °C, 2:1 solvent/monomer ratio with 3 wt% of enzyme at 25 bar and 50 bar and with 5 wt% enzyme at 25 bar and 50 bar and 120 bar. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.6 - Comparison of  $M_n$  and  $M_w$  for kinetic assays performed at 50 bar, 5% enzyme, 65°C and 2:1 solvent/monomer ratio using LPG and at 120 bar, 5% enzyme at 65°C and 1:2 solvent/monomer ratio using CO<sub>2</sub>. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figure 5.7 - Polycaprolactone samples obtained for LPG reactions at 65 °C and solvent/monomer ratio of 2:1 for: A) 50 bar and B) 120 bar, with 5% of enzyme for 12 h of reaction; C) 2 h; D) 8 h, with 5% of enzyme at 50 bar; E) 3 wt% and F) 5 wt%, at 50 bar for 8 h of reaction. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6.1 - Comparação dos resultados da cinética de variação de rendimento para a produção de policaprolactona com o uso de 3% de enzima a 65°C em três condições: sem solvente a pressão ambiente, utilizando GLP como solvente na razão de solvente/monômero de 1:2 e pressão de 120 bar, utilizando CO<sub>2</sub> como solvente na razão solvente/monômero de 2:1 e pressão de 25 bar. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6.2 - Comparação dos resultados da cinética em termos de  $M_n$  para a produção de policaprolactona com o uso de 3% de enzima a 65°C em três condições: sem solvente a pressão ambiente, utilizando GLP como solvente na razão de solvente/monômero de 1:2 e pressão de 120 bar, utilizando CO<sub>2</sub> como solvente na razão solvente/monômero de 2:1 e pressão de 25 bar. .... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6.3 Comparação dos resultados da cinética em termos de  $M_w$  para a produção de policaprolactona com o uso de 3% de enzima a 65°C em três condições: sem solvente a pressão ambiente, utilizando CO<sub>2</sub> como solvente na razão de solvente/monômero de 1:2 e pressão de 120 bar,

utilizando GLP como solvente na razão solvente/monômero de 2:1 e pressão de 25 bar..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 6.4 - Comparação dos resultados da cinética de variação de produtividade para a produção de policaprolactona com o uso de 3% de enzima a 65°C em três condições: sem solvente a pressão ambiente, utilizando GLP como solvente na razão de solvente/monômero de 1:2 e pressão de 120 bar, utilizando CO<sub>2</sub> como solvente na razão solvente/monômero de 2:1 e pressão de 25 bar..... **Erro! Indicador não definido.**

## LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Níveis das variáveis investigadas nos planejamentos experimentais.....	84
Tabela 3.2 - Condições de pressão, razão mássica solvente/ monômero, quantidade de enzima, temperatura e tempo investigadas nas cinéticas de polimerização com CO <sub>2</sub> , GLP e sem o uso de solvente. ....	84
Table 4.2.1- Results of reaction yield (Y), M <sub>n</sub> , M <sub>w</sub> and PI for two hour reactions of lipase-catalyzed poly(ε-caprolactone) production in CO <sub>2</sub> at 65 °C for each condition of pressure (P), enzyme content ([E]) and solvent/monomer mass ratio (S/M) and phase type (PT). ....	112
Table 4.2.2 - Yield rate (YR) and maximum yield rate time (ty) obtained with the SAS for windows software for the results at the conditions of 120 bar, 1:2 solvent/monomer ratio, 65°C and enzyme contents of 1 wt%, 3 wt%, 5 wt% and 15 wt% .....	118
Table 4.2.3 - Melting temperature (T <sub>m</sub> ) and crystallinity degree (X <sub>c</sub> ) results for the polymer samples obtained at the reaction times of 1h, 6 h and 20 h at the conditions of 3 wt% enzyme, 120bar, solvent/monomer ratio of 1:2 and 65°C. ....	123
Table 5.1 - Results of reaction yield (Y), M <sub>n</sub> , M <sub>w</sub> and PI for two- hour reactions of lipase-catalyzed poly(ε-caprolactone) production in LPG at 65 °C for each condition of pressure (P), enzyme content ([E]) and solvent/monomer mass ratio (S/M) .	
<b>Erro! Indicador não definido.</b>	
Table 5. 2 - Yield rate and maximum yield rate time obtained with the SAS for windows software for the results at the conditions of 3 wt% enzyme/25 bar, 5 wt% enzyme/50 bar and 5 wt% enzyme/120 bar with solvent/monomer ratio of 2:1 at 65°C. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Table 5.3 - Melting temperature (T <sub>m</sub> ) and crystallinity (X <sub>c</sub> ) results for the polymer samples obtained at the reaction times of 1h, 6 h and 20 h at the conditions of 3 wt% enzyme, 25 bar, solvent/monomer ratio of 2:1 and 65°C.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Table 5.4 - Productivity rate (PR) and maximum productivity rate time (tp) obtained with the SAS for windows software for the results at the conditions of 3 wt% enzyme/25 bar, 5 wt% enzyme/50 bar and 5 wt% enzyme/120 bar with solvent/monomer ratio of 2:1 at 65°C.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
Tabela 6.1 - Velocidade de rendimento de reação (yr), e tempo de velocidade de rendimento de reação (ty) obtidos com o uso do software	

SAS para os resultados das cinéticas de rendimento de produção de policaprolactona com o uso de 3% de enzima a 65°C. ....

**Erro! Indicador não definido.**

## CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

A necessidade de se desenvolver processos limpos que possibilitem a obtenção de produtos livres de resíduos tóxicos, tanto para aplicação na área farmacêutica quanto alimentícia, possibilitou que processos de polimerização mediados por enzimas se tornassem atrativos. Enquanto os processos tradicionais de polimerização utilizam compostos metálicos tóxicos como catalisadores que podem deixar resíduos nos produtos e aumentar a poluição ambiental, as enzimas, notadamente na forma imobilizada, se apresentam como uma alternativa limpa aos catalisadores convencionais.

Além de serem derivadas de fontes renováveis, as enzimas atuam geralmente em condições brandas de temperatura, pressão e pH. Ainda, as enzimas não requerem a exclusão da água ou ar quando usadas como catalisadores na síntese de poliésteres (VARMA et al, 2005) porque a é essencial para sua atividade. A polimerização via rota química tradicional, por outro lado, exige a utilização de monômeros puros, de atmosfera inerte, de condições anidro e de iniciadores organometálicos. Estes metais devem ser completamente separados dos polímeros para o uso em aplicações biomédicas (AL-AZEMI et al, 2002). Outra vantagem da utilização das enzimas para polimerização é que ao contrário da polimerização catalisada por metais, enzimas tendem a ser enantiosseletivas, ou seja, há produção preferencial de um dos enantiômeros do polímero (AL-AZEMI; KONDAVERTI; BISHT, 2002; DUXBURY et al, 2007; HANS; KEUL; MOELLER, 2009; SCHULZE; WUBBOLTS, 1999). Além disso as enzimas apresentam quimiosseletividade (IGLESIAS; BALDESSARI; GROS, 1996; SCHULZE; WUBBOLTS, 1999) e a reação ocorre seletivamente em um grupo químico levando à formação do produto correspondente. Elas são também regiosseletivas (SCHULZE; WUBBOLTS, 1999). Uma reação regiosseletiva é aquela em que uma direção de formação de ligação ou quebra de ligação ocorre preferencialmente em detrimento de todas as outras direções possíveis (IUPAC, 2011).

O emprego de enzimas para a produção de polímeros biodegradáveis vem sendo estudado pela comunidade acadêmica em aplicações envolvendo diversos monômeros como  $\epsilon$ -caprolactona,  $\beta$ -propiolactona,  $\beta$ -butirolactona,  $\gamma$ -butirolactona,  $\delta$ -valerolactona, 1,5-dioxepan-2-ona, octanolídeo, 12-dodecanolídeo, 15-pentadecanolídeo, além de lactídeos e dicarbonatos cíclicos (ALBERTSSON;

SRIVASTAVA, 2008). Dentre estes cabe destacar a  $\epsilon$ -caprolactona por sua aplicação em uma vasta variedade de estruturas para fins biomédicos e alimentícios como nanoesferas (LEE et al, 2003), nanofibras (MAVIS, et al, 2009), espumas (MARRAZZO; MAIO; IANNACE, 2008), malhas e *scaffolds* (LUCIANI et al, 2008; HUANG et al, 2007, ZEIN et al, 2002). Estas últimas, são estruturas desenvolvidas para permitir o crescimento de células, com aplicação em implantes para substituir partes de tecido ósseo.

A policaprolactona foi um dos primeiros polímeros sintetizados em 1930 pelo grupo de pesquisa liderado por Wallace Carothers (VAN NATTA; HILL; CARRUTHERS, 1934 apud WOODRUFF; HUTMACHER, 2010), um químico americano, cientista da DuPont<sup>1</sup>, a quem foi creditado a invenção do nylon. Materiais como a policaprolactona, definidos como bioreabsorvíveis, apresentam a característica de serem completamente eliminados do corpo humano por produtos e subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molecular) sem efeitos colaterais residuais (VERT et al, 1992).

Segundo WOODRUFF e HUTMACHER (2010), o grande desenvolvimento de polímeros considerados absorvíveis deu-se nas décadas de 1970 e 1980. Nesta época, a policaprolactona e seus copolímeros foram amplamente empregados em dispositivos para liberação de medicamentos. Esta atenção se deveu a inúmeras vantagens frente a outros polímeros em uso no momento. A policaprolactona apresenta facilidade de moldagem e fabricação. Além disso tem propriedades mecânicas e cinética de degradação adequadas para conduzir tecido em crescimento e para liberação controlada de fármacos contidos dentro de sua matriz. Ainda, a policaprolactona permite que grupos funcionais sejam adicionados ao polímero para torná-lo mais adesivo, hidrofílico ou biocompatível, favorecendo as respostas celulares (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Atualmente a policaprolactona voltou a ser amplamente estudada. Isso se deu a partir do nascimento do campo da engenharia de tecidos e

---

<sup>1</sup> A DuPont é uma empresa sediada em Wilmington, Dinamarca, que atua nos segmentos agrícola, químico, petroquímico, automobilístico, gráfico e nas áreas de embalagens, polímeros industriais, eletrônica, construção, decoração, segurança, papel, celulose, produtos domésticos e biotecnologia (DUPONT, 2012).

da percepção de que a policaprolactona é um material viscoelástico, excelente para aplicação nesta área. Além disso, as rotas de produção da PCL são relativamente baratas em comparação com outros poliésteres alifáticos. Outro fator importante, segundo Woodruff e Hutmacher (2010), é que dispositivos de liberação de medicamentos fabricados com PCL já apresentam aprovação do FDA (*Food and Drug Administration*) e registo de marca (*CE Mark*) permitindo uma via de saída mais rápida para o mercado. Vários produtos com policaprolactona em sua composição estão comercialmente disponíveis, dentre eles, o contraceptivo de longa duração Capronors<sup>®</sup> (NAIR; LAURENCIN, 2006; NAIR; LAURENCIN, 2007), as fibras copoliméricas para sutura, chamadas de Monacryl<sup>®</sup>, o veículo de liberação de drogas denominado SynBiosys<sup>®</sup> (NAIR; LAURENCIN, 2007), o implante no formato de cogumelo utilizado para preencher furos craniais de nome comercial Osteoplug<sup>®</sup> (LOW et al, 2009) e o Resilon<sup>®</sup>, um copolímero termoplástico utilizado para preenchimento do canal da raiz do dente (JIA, 2003; JIA; TROPE; ALPERT, 2005; JIA, 2005).

Labet e Thielemans (2009) apresentam uma completa revisão sobre a produção da policaprolactona, citando os diferentes solventes e iniciadores utilizados. Os autores apontam também que a polimerização enzimática de PCL em dióxido de carbono supercrítico é um tema recente de estudo com trabalhos de Loeker et al (2004), Nakaoki, Kitoh e Gross (2005) e Thurecht et al (2006).

O dióxido de carbono supercrítico é barato, não é tóxico, não é inflamável (KUMAR; MADRAS; MODAK, 2004) e apresenta propriedades de transporte que podem acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2000). De forma geral, os fluidos supercríticos ou pressurizados, como o dióxido de carbono (gases em C.N.T.P.<sup>2</sup>), podem ser facilmente separados do produto final por despressurização do sistema e por isso podem ser reutilizados no processo. Dentre as pesquisas relativas à polimerização enzimática com solventes pressurizados não foram encontrados estudos com o Gás Liquefeito de Petróleo (GLP). O GLP tem como principais componentes o propano e o n-butano, substâncias que apresentam baixos valores de constante dielétrica, similares ao do dióxido de

---

<sup>2</sup> C.N.T.P – Condições Normais de Temperatura e Pressão.

carbono. O uso do GLP apresenta algumas vantagens com relação ao CO<sub>2</sub> como o custo inferior e a possibilidade de operação em pressões mais amenas.

Desta forma, este trabalho focará no estudo da produção de policaprolactona por via enzimática em meio pressurizado empregando-se tanto o dióxido de carbono como o GLP.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral deste trabalho é investigar a produção de poli ( $\epsilon$ -caprolactona) utilizando lipases como catalisador enzimático em CO<sub>2</sub> e GLP para determinar as melhores condições de operação.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Construir um reator de volume variável com visualização para realização dos experimentos de polimerização.
- b) Escolher uma lipase com bom desempenho dentre as comumente utilizadas para produção de poliésteres, para atuar como catalisador na produção de policaprolactona.
- c) Avaliar estatisticamente o efeito da pressão de operação, da concentração da lipase selecionada e da razão mássica entre solvente e monômero no rendimento de reação, massa molecular numérica média ( $M_n$ ), massa molecular ponderal média ( $M_w$ ) e índice de polidispersão (IP) do polímero obtido na polimerização de  $\epsilon$ -caprolactona em meio pressurizado utilizando CO<sub>2</sub> e GLP.
- d) Avaliar o efeito da porcentagem de enzima com relação à massa de monômero na cinética de polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona em termos de rendimento de reação,  $M_n$ ,  $M_w$  e IP dos polímeros obtidos utilizando CO<sub>2</sub> e GLP em meio pressurizado e avaliar o efeito da temperatura de operação sobre o rendimento de reação da cinética de polimerização da  $\epsilon$ -caprolactona.
- e) Avaliar o efeito da pressão de operação sobre o rendimento de reação,  $M_n$ ,  $M_w$  e IP nas cinéticas realizadas com o uso de GLP como solvente.

- f) Avaliar por DSC (*Differential Scanning Calorimetry*) o grau de cristalinidade ( $X_c$ ) e a temperatura de fusão ( $T_m$ ) dos polímeros obtidos na cinética de polimerização.
- g) Determinar a atividade enzimática da enzima comercial utilizada (Novozym 435<sup>®</sup>) com CO<sub>2</sub> com a finalidade de verificar o impacto das condições reacionais sobre a enzima indicando a possibilidade de reúso.
- h) Definir as melhores condições de processo: temperatura, pressão, porcentagem de enzima, razão solvente/monômero e tempo de reação para os ensaios de reúso em CO<sub>2</sub> e GLP.
- i) Avaliar o número de ciclos em que a enzima pode ser reutilizada no processo de polimerização.
- j) Comparar os resultados de rendimento,  $M_n$ ,  $M_w$ ,  $X_c$  e  $T_g$  dos polímeros obtidos a alta pressão com o uso de CO<sub>2</sub> e GLP e a baixa pressão sem o uso de solvente.

## 1.2. ESTRUTURA DO DOCUMENTO

Este trabalho encontra-se organizado da seguinte forma: o Capítulo 1 apresenta a introdução e os objetivos do trabalho. No Capítulo 2 é apresentada a Revisão Bibliográfica que discorre sobre alguns conceitos relacionados aos polímeros. Na sequência são tratados os biopolímeros, com especial atenção para a  $\epsilon$ -caprolactona e suas características. As enzimas e sua atuação nas reações de abertura de anel também são temas abordados nesse capítulo. As especificidades deste tipo de reação são discutidas, bem como o papel dos fluidos pressurizados e sua influência sobre as enzimas. No Capítulo 3 são apresentados os materiais e métodos utilizados nas reações de polimerização e nas medidas de atividade enzimática e caracterização dos polímeros obtidos. O Capítulo 4 trata da construção de unidade de reação no Laboratório de Termodinâmica e Extração Supercrítica da UFSC (Universidade Federal de Santa Catarina). Os Capítulos 4 e 5 apresentam, na forma de artigos, os resultados produzidos nesta tese, sendo que: o Capítulo 5 refere-se aos resultados dos experimentos em CO<sub>2</sub>, avaliando estatisticamente os efeitos de pressão, conteúdo de enzima e razão solvente/monômero sobre rendimento de reação, massa molecular e índice de polidispersão e as cinéticas de polimerização em termos de rendimento de reação,  $M_n$ ,  $M_w$ , IP e produtividade em diversas condições de porcentagem de enzima com relação ao substrato

e temperaturas, assim como um estudo sobre o reuso da enzima e sobre a temperatura de fusão e grau de cristalinidade dos polímeros obtidos. O Capítulo 6 trata da avaliação estatística dos resultados dos experimentos em GLP assim como proposto previamente para CO<sub>2</sub>, apresenta também as cinéticas de polimerização em termos de rendimento de reação, M<sub>n</sub>, M<sub>w</sub>, IP e produtividade em diversas condições de porcentagem de enzima com relação ao substrato e diversas pressões de operação, assim como um estudo sobre o reuso da enzima e sobre a temperatura de fusão e grau de cristalinidade dos polímeros obtidos. Finalmente, é apresentada no Capítulo 7 uma comparação entre os resultados obtidos para as reações com o uso de CO<sub>2</sub> e GLP a alta pressão e as reações à baixa pressão sem o uso de solvente. As Conclusões deste trabalho e sugestões de trabalhos futuros são apresentadas no Capítulo 8. O Apêndice I apresenta o projeto da estrutura para abrigar o reator, o Apêndice II apresenta os cálculos da espessura do reator, enquanto o Apêndice III traz os projetos do reator de volume variável. No Apêndice IV apresenta-se a rotina implementada para determinação das velocidades de reação, e os relatórios obtidos pelo software SAS for Windows. Os gráficos de Pareto que fazem parte das análises estatísticas dos Capítulos 4 e 5 são apresentados no Apêndice V. A patente relativa à produção de policaprolactona utilizando GLP como solvente é apresentada no Apêndice VI. A lista as publicações já realizadas como resultado do presente trabalho no Apêndice VII.

### 1.3 REFERÊNCIAS

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

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

DUPONT. Disponível em <http://www2.dupont.com/home/en-us/index.html>. Acesso em 31 de outubro de 2012.

DUXBURY et al. Enzyme-Responsive Materials: Chirality to Program Polymer Reactivity. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 44, p. 8452–8454, 2007.

HANS, H. et al. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone by means of mono and multifunctional initiators: Comparison of Chemical and Enzymatic Catalysis. **Macromolecule**, v. 39, p. 3184-3193, 2006.

HUANG, H. et al. Biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network. **Biomaterials**, v. 28, p. 3815–3823, 2007.

IGLESIAS, L. E., BALDESSARI, A., GROS, E. G. Lipase-catalyzed chemospecific O-acylation of 3-mercaptoopropanol and 4-mercaptobutanol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p.853-856, 1996.

IUPAC. **Compendium of Chemical Terminology**. Disponível em: <http://old.iupac.org/goldbook/R05243.pdf>. Acesso em: 10 de novembro de 2011.

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

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

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

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

LABET, M., THIELEMANS, W. Synthesis of polycaprolactone: a review. **Chemical Society Reviews**, v. 38, p. 3484-3508, 2009.

LEE, K. H. et al. Characterization of nano-structured poly(epsilon-caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. **Polymer.**; v.44, p.1287–1294, 2003.

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

LOW, S.W. et al. Use of Osteoplug polycaprolactone implants as novel burr -hole covers. **Singapore Medical Journal**, v. 50, n.8, p.777-780, 2009.

LUCIANI, A. et al. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. **Biomaterials**, v.29, p.4800–5807, 2008.

MARRAZZO C., DI MAIO E., IANNACE S. Conventional and nanometric nucleating agents in poly(epsilon-caprolactone) foaming: crystals vs. bubbles nucleation. **Polymer Engineering & Science**, v.48, p.336–344, 2008.

MAVIS, B. et al. Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. **Acta Biomaterialia**, v. 5, n. 8, p.3098-3111, 2009.

NAKAOKI, T.; KITOH, M.; GROSS, R. Enzymatic Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone in Supercritical CO<sub>2</sub>. **Polymer Biocatalysis and Biomaterials**, v. 27, p. 393–404, 2005.

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

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

OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Kinetics of the enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in supercritical CO<sub>2</sub>. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39 ,p. 4450-4454, 2000.

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

THURECHT, K. et al. Kinetics of enzymatic ring-opening polymerization of  $\epsilon$ - caprolactone in supercritical carbon dioxide. **Macromolecules**, v. 39, n.23, p. 7967–7972, 2006.

VAN NATTA F. J.; HILL, J. W.; CARRUTHERS W. H. Polymerization and ring formation, -caprolactone and its polymers. **Journal of the American Chemical Society**, v.56, p.455–459, 1934.

VARMA, I. K et al. Enzyme catalyzed synthesis of polyesters. **Progress in Polymer Science**,v. 30, n. 10, p. 949-981, 2005.

VERT, M et al. Bioresorbability and biocompatibility of aliphatic polyesters. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v.3, p.432–446, 1992.

WOODRUFF, M. A.; HUTMACHER, D.W. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. **Progress in Polymer Science**, v. 35, p.1217–1256, 2010.

ZEIN, I et al. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. **Biomaterial**, v.23, p.1169–1185, 2002.



## **CAPÍTULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 POLÍMEROS**

Os polímeros são compostos químicos de elevada massa molecular resultantes de reações químicas de polimerização. São macromoléculas formadas pela repetição de unidades químicas chamadas *meros* ou unidades monoméricas. A polimerização é uma reação em que as moléculas menores (monômeros) se combinam quimicamente (por valências principais) para formar moléculas longas, mais ou menos ramificadas com a mesma composição centesimal. As cadeias poliméricas podem ser classificadas quanto à estrutura em: linear, onde os *meros* são ligados entre si formando uma unidade contínua; ramificada, quando possui cadeias laterais; reticulada, contendo ligações cruzadas entre cadeias adjacentes; ou em rede, em que suas unidades estão conectadas de forma tridimensional formando redes. São classificadas também quanto aos tipos de meros que o compõe: homopolímeros, se formados por um único mero, e copolímeros, se formados por mais de um tipo de mero (AKCELRUD, 2007).

Outra forma de classificar os polímeros foi proposta por Carothers em 1929. De acordo com a classificação de Carothers os polímeros são divididos em duas categorias: polímeros de condensação e polímeros de adição. Os polímeros de condensação são formados por reações com eliminação de pequenas moléculas como água, ácido clorídrico ou metanol. Já os polímeros de adição são formados sem que haja saída de moléculas, sendo a estrutura da unidade repetitiva idêntica àquela do monômero. A classificação proposta por Flory em 1953 leva em conta o mecanismo de reação, apresentando duas classes: polimerização em etapas e polimerização em cadeia. A polimerização por etapas inclui todos os polímeros de condensação e aqueles formados por meio de etapas definidas. Em contrapartida, a polimerização em cadeia é a classe atribuída às reações que requerem a formação de um centro ativo ao qual as moléculas de monômero adicionam-se para formar o polímero final (AKCELRUD, 2007).

#### **2.1.1 Massa molecular e sua distribuição**

Sendo os polímeros formados pela repetição de um grande número de unidades químicas que são ligadas entre si por meio de

reações de polimerização, sabe-se que durante tais reações são formadas cadeias de tamanhos diferentes, ou seja, misturas polidispersas. Portanto, a massa molecular de um polímero é expressa como massa molecular média. Existem várias maneiras segundo as quais a massa molecular média pode ser definida. Alguns autores como Lucas, Soares e Monteiro (2001) classificam a massa molecular média em: peso molecular numérico médio ( $M_n$ ) e peso molecular ponderal médio ( $M_w$ ). No entanto, o uso da palavra peso para definir massa molecular soa inadequado e é derivado da tradução do inglês *molecular weight*. Assim, visando evitar o emprego de uma terminologia inadequada, neste trabalho foram adotados os seguintes termos: massa molecular numérica média e massa molecular ponderal média, referentes aos seguintes símbolos  $M_n$  e  $M_w$ , respectivamente. Salienta-se ainda que, apesar de a massa molecular e a massa molar terem o mesmo valor numérico para uma dada substância monodispersa, a unidade de medida de massa molecular é a unidade de massa atômica (u) (MILLS et al., 1993) ou dalton (Da) enquanto a massa molar é definida em gramas por mol (g/mol) (MILLS et al., 1993).

A Equação 2.1 é a representação do conceito clássico de massa molecular numérica média (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

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

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

Callister (2002) apresenta uma definição simplificada e concisa de  $M_n$ : “A massa molecular numérica média,  $M_n$ , é obtida pela classificação das cadeias em uma série de faixas de tamanhos, seguida pela determinação da fração das cadeias que se encontram dentro de cada faixa de tamanho”. A massa molecular numérica média pode ser calculada pela Equação 2.2, equivalente à Equação 2.1:

$$M_n = \sum x_i M_i \quad (2.2)$$

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

Segundo Lucas, Soares e Monteiro (2001) para cálculo do  $M_n$  são utilizados métodos de análise de grupo terminal e de propriedades coligativas que fornecem o número de moléculas por grama de material.

A Equação 2.3 é a representação do conceito clássico de massa molecular ponderal média (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

$$M_w = \frac{\sum N_i M_i^2}{\sum N_i M_i} \quad (2.3)$$

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

Callister (2002) também apresenta uma definição simplificada e concisa de  $M_w$ : “A massa molecular média pela massa,  $M_w$ , se baseia na fração em massa das moléculas que se encontram dentro das várias faixas de tamanho”. O valor de  $M_w$  pode ser calculado pela Equação 2.4, que é equivalente à Equação 2.3:

$$M_w = \sum w_i M_i \quad (2.4)$$

onde  $M_i$  representa a massa molecular média dentro de uma faixa de tamanho, enquanto  $w_i$  representa a fração em massa das moléculas dentro do mesmo intervalo de tamanhos.

O índice de polimerização ou grau de polimerização (GP) é o número de unidades monoméricas que se repetem ao longo da cadeia polimérica. O valor de GP pode ser calculado em função de  $M_n$  ou  $M_w$  e é dado pelas Equações 2.5 e 2.6, dependendo do tipo massa molecular considerada. Quando maior o grau de polimerização maior o tamanho da molécula.

$$M_n = GP \cdot m_u \quad (2.5)$$

$$M_w = GP \cdot m_u \quad (2.6)$$

onde  $m_u$  é massa molecular do mero.

A dispersão da massa molecular, ou índice de polidispersão (IP), é determinada pela razão entre a massa molecular ponderal média e a massa molecular numérica média (Equação 2.7). Para amostras monodispersas, ou seja, com índice de polidispersão (IP) muito próximo de um, os valores de  $M_n$  e  $M_w$  são praticamente idênticos (LUCAS; SOARES; MONTEIRO, 2001).

$$IP = \frac{M_w}{M_n} \quad (2.7)$$

## 2.1.2 Policaprolactona

### 2.1.2.1 Propriedades e aplicações

A policaprolactona (PCL), poliéster sintético de cadeia linear, também é conhecida como poli(6-hidroxihexanoato) (P(6-HH)). Ela faz parte do grupo de polímeros definidos como absorvíveis ou bioreabsorvíveis. Estes são materiais que tem a característica de serem completamente eliminados do corpo humano através de produtos e subprodutos de degradação (compostos de baixa massa molecular), sem efeitos colaterais residuais (VERT et al, 1992). Dentre diversos poliésteres alifáticos abordados na literatura, a policaprolactona e seus copolímeros têm demonstrado ótimas propriedades como alta flexibilidade, biodegradabilidade e biocompatibilidade, além de não toxicidade. Estes atributos favoráveis conferem à PCL a característica de ser a classe mais atrativa e útil de poliésteres biodegradáveis (PITT; MARKS; SCHINDLER, 1980 apud HARRANE et al, 2006).

A Figura 2.1 mostra a estrutura química do monômero  $\epsilon$ -caprolactona (SIGMA-ADRIK, 2011), do qual é formado o polímero poli( $\epsilon$ -caprolactona), também apresentado na Figura 2.1, pela reação de polimerização por abertura do anel empregando-se monômero de  $\epsilon$ -caprolactona.

Segundo Nair e Laurecin (2007) a policaprolactona é um poliéster hidrofóbico e semi-cristalino. Possui temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ) de  $-60^\circ\text{C}$  e ponto de fusão cristalina variando entre  $59^\circ\text{C}$  e  $64^\circ\text{C}$  (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). A explicação para existir uma faixa de temperaturas para fusão de um polímero vem do fato de na região cristalina do polímero existir cristais de diferentes tamanhos,

portanto, a temperatura em que a fusão se inicia é diferente da temperatura em que ela é concluída (CANAVEROLO, 2001). A polycaprolactona é solúvel em clorofórmio, diclorometano, tetracloreto de carbono, benzeno, tolueno, ciclohexanona e 2-nitropropano em temperatura ambiente; possui baixa solubilidade em acetona, dimetilformamida e acetonitrila e é insolúvel em álcool, éter de petróleo e éter etílico (COULEMBIER et al, 2006).

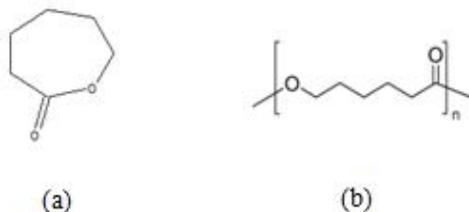


Figura 2.1 - Estrutura química da  $\epsilon$ -caprolactona e poli( $\epsilon$ -caprolactona). (a)  $\epsilon$ -caprolactona na sua forma cíclica, anel de sete membros com fórmula molecular  $C_6H_{10}O_2$ . (b) Unidade monomérica repetitiva da poli( $\epsilon$ -caprolactona),  $\epsilon$ -caprolactona com o anel aberto.  
Fonte: Sigma-Aldrich (2011).

A polycaprolactona possui muitas vantagens frente a outros polímeros empregados em dispositivos de liberação de medicamentos/vacinas de longa duração, e em materiais de sutura que degradam lentamente (Maxon<sup>®</sup>) (NAIR; LAURENCIN, 2007; WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). A degradação da PCL tem um ritmo mais lento (2-3 anos) do que outros polímeros absorvíveis como polilactídeos e poliglicolídeos e possui alta permeabilidade a muitas drogas. Permite que grupos funcionais sejam adicionados ao polímero para torná-lo mais adesivo, hidrofílico ou biocompatível. Além disso, as rotas de produção da PCL são relativamente baratas em comparação com outros poliésteres alifáticos. A polycaprolactona também é adequada para aplicação no campo da engenharia de tecidos pois apresenta facilidade de moldagem e fabricação, cinética de degradação adequada, tamanhos de poros e propriedades mecânicas propícias para conduzir tecido em crescimento (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010).

Atualmente a  $\epsilon$ -caprolactona é empregada em uma vasta variedade de estruturas para aplicações biomédicas e alimentícias como

nanoesferas (LEE et al, 2003), nanofibras (MAVIS, et al. 2009), espumas (MARRAZZO; MAIO; IANNACE, 2008), malhas e *scaffolds* (LUCIANI et al,2008; HUANG et al,2007; ZEIN et al,2002).

A Figura 2.2 apresenta um osso fêmur (identificado pelo número 1) ao lado de um *scaffold* (número 2). Os *scaffolds* são estruturas tridimensionais desenhadas para abrigar o crescimento de células, permitindo a regeneração de tecidos. Estas estruturas tem sua aplicação principalmente como coadjuvante na regeneração de tecidos ósseos e cartilagens (WILLIAMS et al, 2005) substituindo partes de tecido danificado e permitindo seu crescimento à medida que o polímero se degrada.

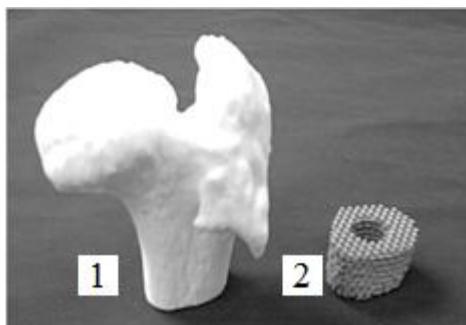


Figura 2.2 - Parte do osso fêmur (1) e scaffold customizado (2).  
Fonte: Naing et al (2005).

Dentre os produtos desenvolvidos, especialmente da área médica, e que empregam a caprolactona em sua composição, pode-se citar o contraceptivo de longa duração Capronors<sup>®</sup> que contém levonorgestrel (NAIR; LAURENCIN, 2006 apud NAIR; LAURENCIN, 2007) e fibras copoliméricas para sutura, formadas por  $\epsilon$ -caprolactona com glicolídeo, chamadas de Monacryl<sup>®</sup>. Além destes há o SynBiosys<sup>®</sup>, um copolímero multibloco bioabsorvível composto de  $\epsilon$ -caprolactona, glicolídeo, lactídeo e polietilenoglicol usado como veículo de liberação de drogas (NAIR; LAURENCIN, 2007), o Osteoplug<sup>®</sup>, um implante no formato de cogumelo utilizado para preencher furos craniais realizados para drenagem de hematomas subdurais crônicos (LOW et al, 2009), e o Resilon<sup>®</sup>, um material termoplástico que contém de 25% a 40% de policaprolactona e de 3% a 10% de dimetacrilatos e é utilizado para

preenchimento do canal da raiz do dente em substituição ao Gutta-percha (JIA, 2003; JIA; TROPE; ALPERT, 2005; JIA, 2005).

### 2.1.2.2 Biodegradabilidade

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

A policaprolactona na condição de poliéster sofre um processo hidrolítico de decomposição mediante o ataque de micro-organismos às ligações éster alifáticas de sua estrutura (TAN et al, 2007; NAIR; LAURENCIN, 2007), portanto pode ser classificada como um polímero biodegradável.

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

As enzimas podem catalisar tanto as reações de abertura de anel quanto de hidrólise. Portanto, diversos autores se dedicaram ao estudo da biodegradabilidade da policaprolactona (SIGMA-ADRICH, 2011) com enzimas (MATSUMURA; OSANAI; TOSHIMA, 2006; SIVALINGAM; CHATTOPADHYAY; MADRAS, 2003). Matsumura, Osanai e Toshima (2006) realizaram um estudo de degradação de policaprolactona comercial de 110.000 Da e obtiveram oligômeros de 1100 Da utilizando 10 % em massa de lipase de *Candida antarctica* em 20 mL de tolueno com 7,5 mL de água durante 6 horas a 70°C. Sivalingam, Chattopadhyay e Madras (2003) estudaram a degradação da policaprolactona com Novozym 435 e Lipolase em diversos solventes como acetona, tolueno, benzeno, álcool benzílico e misturas de água e acetona. Os pesquisadores perceberam que a velocidade de degradação cresceu com o aumento da polaridade do solvente. Ambas as enzimas se mostraram sensíveis à presença de água mostrando o pico de degradação para a concentração de 8,7 % de água em acetona.

## 2.2 ENZIMAS

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

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

Enzimas são consideradas catalisadores não-tóxicos (THURECHT et al, 2006) e biocompatíveis (KOBAYASHI; UYAMA; KIMURA, 2001; VARMA et al, 2005). As polimerizações enzimáticas podem ser realizadas em condições brandas de pressão, temperatura e pH (GEUS, 2007). Apesar de o alto custo da enzima ser o principal empecilho à sua utilização em processos comerciais, os avanços tecnológicos que incluem o estudo da utilização de lipases solvente tolerantes e de lipases imobilizadas, permitindo a reutilização do catalisador, tornaram possível o desenvolvimento de sistemas de baixo custo (FUKUDA; KONDO; NODA, 2001).

A Novozym 435 é uma lipase produzida pela empresa Novozymes S/A. Segundo Geus (2007), a Novozym 435 é um catalisador altamente versátil, com imobilização termoestável e com atividade sobre uma grande variedade de substratos diferentes em vários solventes orgânicos. Nos últimos anos, a Novozym 435 tem sido aplicada também na química de polímeros, na síntese de monômeros e de polímeros, assim como a modificação e a degradação de polímeros (AL-AZEMI; KONDAVETI; BISHT, 2002; BINNS et al, 1999; HANS et al, 2006; KEREP; RITTER, 2006; KOBAYASHI; UYAMA; KIMURA, 2001; KUNDU et al, 2011; LOEKER et al, 2004; MEI; KUMAR; GROSS, 2003; SIVALINGAM; MADRAS, 2004; THURECHT et al, 2006).

A utilização de enzimas como catalisadores na polimerização por abertura de anel é uma alternativa bem vista pela comunidade científica (THURECHT et al, 2006; LOEKER et al, 2004). A polimerização ocorre em condições de temperatura mais amenas comparado com reações de polimerização utilizando catalisadores metálicos. Em geral, as reações catalisadas por enzima ocorrem na temperatura ótima da enzima, o que possibilita economia energética ao processo. Além disso, não há o emprego de compostos metálicos tóxicos. Desta forma, devido à ausência de resíduos tóxicos do catalisador no produto final é possível seu uso em aplicações voltadas às áreas médicas, farmacêuticas e alimentícias.

### 2.3. REAÇÃO DE POLIMERIZAÇÃO

A rota mais empregada para produção de policaprolactona e de seus copolímeros é a polimerização por abertura de anel de ésteres cíclicos (lactonas, lactídeos e glicolídeos) mediante a utilização de uma variedade de catalisadores aniônicos, catiônicos e de coordenação (PITT; MARKS; SCHINDLER, 1990). Para a síntese da PCL, vários compostos metálicos incluindo estanho (KADOKAWA et al, 2002; KRICHELDORF; KREISER-SAUNDERS, 2000), alumínio (MIOLA et al, 1997), zinco (DUDA et al, 2002; WALKER et al, 2003) e outros metais (TORTOSA et al, 2001; YAMASHITA et al, 1996) têm sido utilizados como catalisadores.

A Policaprolactona e outros poliésteres alifáticos como polilactídeos e poliglicolídeos possuem duas rotas de produção distintas: (i) a polimerização por etapas ou policondensação, e (ii) a poliadição de abertura do anel (polimerização em cadeia). A técnica de polimerização por etapas promove a condensação de hidróxi-ácidos ou misturas de diácidos e dióis. As principais desvantagens deste mecanismo de polimerização são as altas temperaturas e os longos tempos de reação envolvidos que favorecem a formação de subprodutos devido às reações secundárias. No entanto, a polimerização por abertura de anel está livre destas limitações (JÉRÔME; LECOMTE, 2008). Por este mecanismo pode se preparar poliésteres de alta massa molecular em condições brandas a partir de lactonas de diferentes tamanhos de anel (LOU; DETREMBLEUR; JÉRÔME, 2003).

Uma vez que neste trabalho a policaprolactona é produzida a partir do monômero cíclico  $\epsilon$ -caprolactona, a rota de produção é a

poliadição ou polimerização por abertura do anel que é explicada em detalhes na seção 2.3.1.

### 2.3.1 Mecanismo da polimerização por abertura do anel

O primeiro exemplo de e-ROP (*Enzymatic Ring-Opening Polymerization*) *in-vitro* foi publicado em 1993 quando Knani, Gutman e Kohn (1993) e Uyama e Kobayashi (1993) publicaram independentemente trabalhos sobre a abertura do anel para polimerização de  $\epsilon$ -CL catalisada por lipase. A massa molecular da PCL obtida foi baixa ( $M_n < 2000$  Da) e a polidispersão excedeu a 5. Desde então, várias lipases foram estudadas na e-ROP, transesterificação e policondensação. Uma revisão extensa das lipases investigadas para polimerizações enzimáticas foi publicada por Kobayashi, Uyama e Kimura (2001) e Gross, Kumar e Kalra (2001) e atualizada por Varma et al (2005). A Novozym 435 tem sido a enzima mais aplicada nas polimerizações enzimáticas por abertura de anel de lactonas (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008). A Novozym 435 é uma Lipase de *Candida antarctica* fração B (CALB), comercialmente disponível imobilizada em uma resina macroporosa reticulada de metacrilato de metila (Lewatit VP OC 1600, Bayer) (MEI et al, 2003). Dentre as diversas lactonas abordadas na literatura para polimerização enzimática por abertura de anel ( $\epsilon$ -caprolactona ( $\epsilon$ -CL),  $\gamma$ -caprolactona ( $\gamma$ -CL),  $\delta$ -caprolactona ( $\delta$ -CL),  $\beta$ -propiolactona ( $\beta$ -PL),  $\beta$ -butirolactona ( $\beta$ -BL),  $\gamma$ -butirolactona ( $\gamma$ -BL),  $\delta$ -valerolactona ( $\delta$ -VL), dentre outras (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008)) a  $\epsilon$ -CL é a mais estudada polimerização catalisada por lipases de diversas origens uma vez que é facilmente disponível e que o polímero obtido é fácil de caracterizar (SIVALINGAM; MADRAS, 2004).

O mecanismo de abertura do anel de polimerização enzimática (e-ROP) é derivado de um mecanismo da transesterificação enzimática como apresentado na Figura 2.3 e que foi proposto por Geus (2007) a partir dos trabalhos de Henderson, Svirkin e Gross (1996) e Uyama et al (1995).

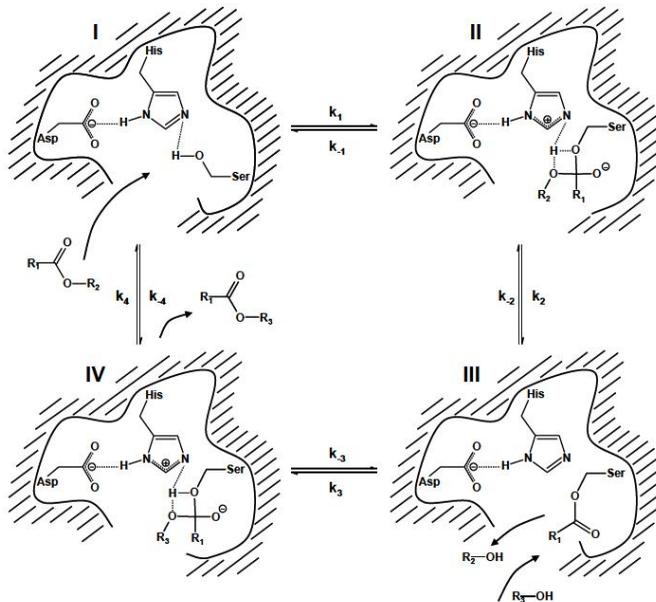


Figura 2.3 – Mecanismo de transesterificação enzimática.

Fonte: Geus (2007).

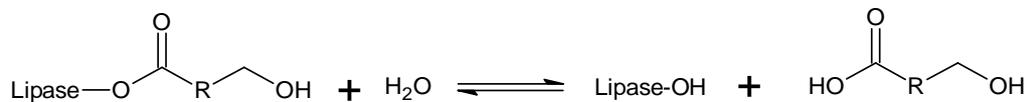
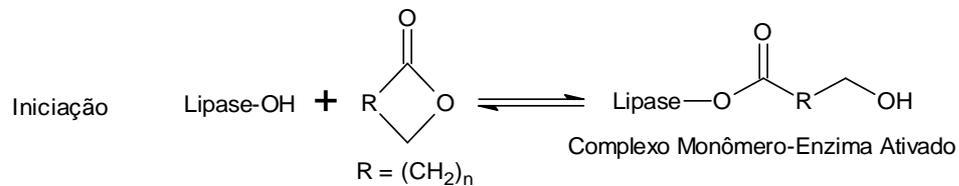
Como apresentado na Figura 2.3, o sítio ativo da lipase, catalisador da reação de transesterificação, é formado por serina (Ser), histidina (His) e aspartato (Asp), uma tríade catalítica. No mecanismo e-ROP apresentado na Figura 2.3, um éster (grupo químico presente na  $\epsilon$ -caprolactona) sofre um ataque nucleofílico do grupo álcool primário de serina no sítio ativo da enzima (I), formando uma espécie intermediária (II). Na transesterificação, o grupo alcóxi original (R<sub>2</sub>-OH) então é liberado (III), formando um complexo monômero-enzima ativado (MEA), do inglês *enzyme activated monomer complex* (III). No caso de uma reação de polimerização por abertura do anel, o grupo alcóxi não será liberado uma vez que a caprolactona é cíclica. O nucleófilo, que na Figura 2.3 é representado por um álcool primário (R<sub>3</sub>-OH), ataca esta espécie MEA (III) formando uma espécie intermediária (IV). Então, o produto final, um polímero de cadeia curta (PCL), é liberado da enzima.

Na polimerização por abertura do anel, o nucleófilo R<sub>3</sub>-OH, que é necessário para regenerar a enzima e criar o polímero, pode ser considerado como o iniciador da polimerização. O anel aberto, formado

após um ciclo catalítico tem em sua estrutura uma molécula-hidroxila de um lado e o iniciador-funcional no outro. Desta forma é possível identificar o iniciador que deu origem à molécula. Quando o iniciador é a água forma-se um ácido  $\omega$ -hidróxi-carboxílico. Diversos nucleófilos já foram utilizados tais como álcoois e aminas (HENDERSON; SVIRKIN; GROSS, 1996; UYAMA; SUDA; KOBAYASHI, 1998) ou ainda iniciadores bifuncionais (GEUS et al, 2005) e água (MEI; KUMAR; GROSS, 2003; THURECHT et al, 2006). No entanto, uma vez que a enzima necessita de água para manter sua estrutura, a utilização de outros nucleófilos resulta em produtos onde frações das cadeias produzidas foram iniciadas por água resultando em uma mistura de cadeias com diferentes grupos terminais (HENDERSON; SVIRKIN; GROSS, 1996).

A etapa de propagação da reação dá-se pelo crescimento da cadeia do ácido  $\omega$ -hidróxi-carboxílico quando esta faz sucessivos ataques nucleofílicos aos complexos MEA (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008) gerando complexos cadeia polimérica enzima ativada (CPEA). Albertsson e Srivastava (2008) apresentaram o mecanismo de polimerização em etapas de lactonas cíclicas por abertura de anel tendo como iniciador a água, como apresentado na Figura 2.4. Nesta Figura, observa-se que na etapa de iniciação ocorre a ruptura do anel do monômero formando o complexo MEA. Na sequência o complexo sofre ataque pela água (iniciador), liberando a lipase e originando um polímero de cadeia curta, o ácido  $\omega$ -hidróxi-carboxílico. Durante a etapa de propagação o ácido  $\omega$ -hidróxi-carboxílico ou uma cadeia maior formada previamente, faz sucessivos ataques nucleofílicos aos complexos ativos formados.

As polidispersões obtidas na polimerização por abertura de anel variam tipicamente de 1,4 a 3,2 e a formação de polímero cíclico por transesterificação intramolecular tem sido reportada na literatura (CORDOVA et al, 1998; MATSUMURA; EBATA; TOSHIMA, 2000). Uma vez que a função da enzima é ativar ligações éster, ela pode escolher ativar o grupo éster dos monômeros ou dos polímeros presentes no meio reacional, dependendo da afinidade da enzima com um ou com outro (KUMAR; GROSS, 2000). A transesterificação ocorre quando um nucleófilo ataca a Cadeia Polimérica Enzima Ativada (CPEA), causando a transferência de cadeia ou a formação de anel, como mostrado na Figura 2.5 (GEUS, 2007).



Propagação

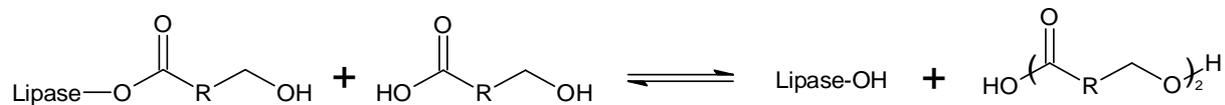


Figura 2.4 - Mecanismo de polimerização em etapas de lactonas cíclicas por abertura de anel tendo como iniciador a água.  
 Fonte: Albertsson e Srivastava (2008).

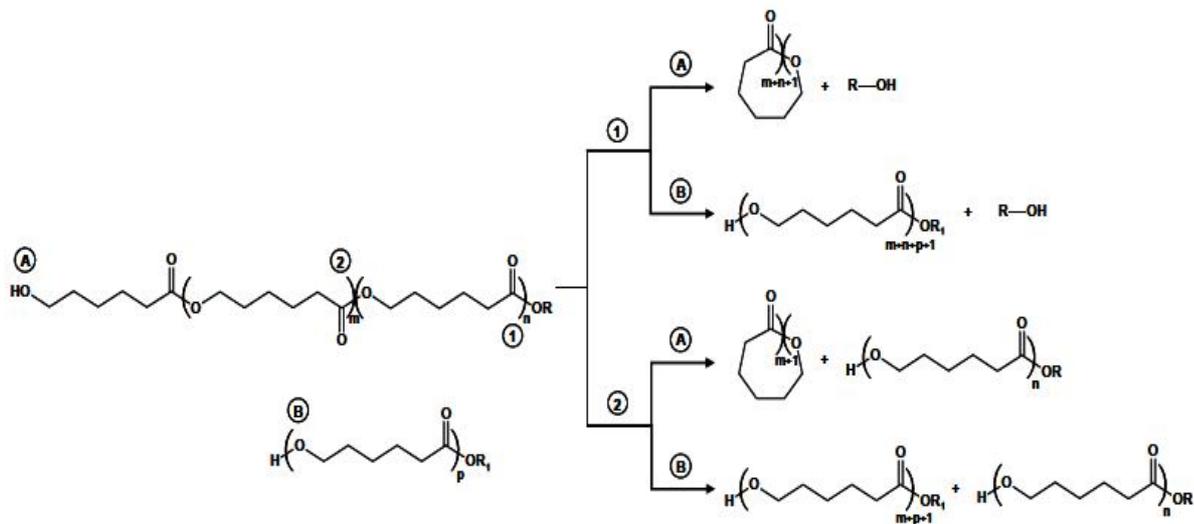


Figura 2.5 - Reações de transesterificação possíveis em um processo de polimerização de abertura de anel catalisada por lipase. Os números referem-se ao grupo carboxílico que é ativado pela enzima, as letras se referem ao grupo nucleofílico. Fonte: Geus (2007).

A Figura 2.5 apresenta as reações de transesterificação possíveis no mecanismo apresentado na Figura 2.3. A ativação (Item I da Figura 2.3) pode ocorrer em qualquer grupo carboxílico. Da mesma forma, as cadeias poliméricas formadas possuem uma terminação hidroxila resultante da atuação da água como nucleófilo na etapa de abertura do anel, portanto as estas cadeias também podem atuar como nucleófilo (Item III da Figura 2.3). Portanto, dependendo do local exato da ativação, no final da cadeia de polímero ou ao longo da cadeia, e do tipo de nucleófilo que reage com essas espécies CPEA, diferentes espécies de polímeros podem ser obtidos por transesterificação: se um grupo carboxílico final de uma cadeia polimérica é ativado (1), e nucleofilicamente atacado pelo grupo hidroxila final da mesma cadeia (A), água ou iniciador será liberado e uma cadeia de polimérica cíclica será formada. Este tipo de transesterificação intramolecular é chamada de condensação *end-to-end*. Quando o grupo carboxílico final de uma cadeia polimérica é ativado (1) e atacado pelo grupo hidroxila final de uma outra cadeia polimérica (B), novamente iniciador ou água é formado, mas agora uma cadeia polimérica linear será formada, que pode ser considerada como uma cadeia extensa. Se uma carbonila na cadeia de polímero é ativada (2), reações semelhantes acontecem. Quando esta cadeia polimérica enzima-ativada é atacada pelo grupo hidroxila final do mesmo polímero (A), será formada uma cadeia cíclica e uma cadeia polimérica linear com menor massa molecular. Quando a carbonila ativada é atacada por um grupo hidroxila final de outra cadeia polimérica (B), duas cadeias serão criadas, geralmente uma menor do que as cadeias originais, e outra mais longa. (GEUS, 2007, p. 20, tradução nossa).

Relata-se que o controle sobre a quantidade de água no meio reacional tem papel crucial no tamanho das cadeias obtidas pela e-ROP (MEI; KUMAR; GROSS, 2002). O conteúdo de água presente no meio reacional afeta a polimerização e a degradação da policaprolactona (DONG et al, 1999; SIVALINGAM; CHATTOPADRAY; MADRAS, 2003). Observa-se que com conteúdos maiores de água ocorre a hidrólise das ligações éster alifáticas das cadeias de policaprolactona (MATSUMURA; OSANAI; TOSHIMA, 2006; THURECHT et al, 2006). No entanto, a água tem um papel importante na conformação e flexibilidade das enzimas (SIVALINGAM; CHATTOPADRAY; MADRAS, 2003) e atua como iniciador da reação (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008). A água também tem um papel importante na

estabilidade da enzima (ADLERCREUTZ, 1991; ZAKS; KLIBANOV, 1988). Fica claro que a quantidade correta de água é um fator chave tanto para a estabilidade da enzima quanto para a obtenção de cadeias de polímero de alta massa molecular.

As enzimas contêm água em três diferentes níveis. O estado de hidratação primário é de água ligada, não disponível para trocas. Refere-se a água que estabiliza a conformação ativa da enzima, hidratando todos os grupos polares e iônicos. O segundo estado representa a água fracamente ligada à enzima. Supõe-se que esta água faz a cobertura completa dos locais de ligação de hidrogênio e forma uma monocamada em todas as superfícies não-polares. Esta água se liga fracamente à enzima e portanto pode ser trocada com a água no terceiro estado, a água "livre". A água do terceiro estado, isto é a fracamente ligada ou água "livre", sem função específica (GEUS, 2007, p. 23, tradução nossa).

Além da água, a temperatura do sistema e o solvente empregado na reação de polimerização tem um papel importante na qualidade do produto final (LOEKER et al, 2004; MEI; KUMAR; GROSS, 2002). Loeker et al (2004) estudaram a polimerização da caprolactona em dióxido de carbono supercrítico e obtiveram menores índices de polidispersão quando comparados aos obtidos com solventes convencionais como o tolueno. Mei, Kumar e Gross (2002) estudaram a polimerização de caprolactona catalisada pela lipase Novozym 435 para temperaturas entre 20 e 108 °C e estabeleceram relações de influência entre o conteúdo de água da enzima e a temperatura da reação no número de cadeias de polímeros obtidas e na cinética de reação.

### **2.3.2 Uso de fluidos pressurizados na polimerização**

As preocupações ambientais têm alertado a comunidade científica no sentido de investigar novas maneiras de diminuir o uso de solventes orgânicos voláteis. Para este efeito, o uso de fluidos supercríticos aparece como uma alternativa interessante (JÉRÔME; LECOMTE, 2008). Fluidos supercríticos têm recebido grande atenção porque podem permitir velocidades de reação mais altas do que os solventes convencionais. A facilidade de se manipular as propriedades físicas dos fluidos supercríticos permite melhor controle das condições de reação e facilita a remoção do solvente após a reação (REZAEI; TEMELLI; JENAB, 2007). Fluidos supercríticos apresentam propriedades como

densidade, difusividade e viscosidade com valores intermediários aos apresentados por líquidos e gases. A difusividade superior a de gases e a viscosidade inferior a de líquidos facilita a transferência de massa e de calor e torna os fluidos supercríticos atrativos como solventes em reações químicas (RUSSELL; BECKMAN, 1991; SAVAGE et al, 1995).

Entre os fluidos supercríticos disponíveis, o dióxido de carbono supercrítico ( $\text{scCO}_2$ ) é um dos mais empregados devido à sua baixa toxicidade, baixo custo, não inflamabilidade e parâmetros críticos de fácil acesso ( $T_c = 31,4 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $P_c = 73,8 \text{ bar}$ ). Além disso, o  $\text{CO}_2$  é amplamente disponível em alta pureza a partir de fontes comerciais e industriais e também pode ser reutilizado (JÉRÔME; LECOMTE, 2008).

O  $\text{CO}_2$  é altamente compressível nas vizinhanças do seu ponto crítico. Assim, próximo desta região, a sua densidade, e por consequência os parâmetros de solubilidade e de constante dielétrica podem ser alteradas manipulando-se as condições de pressão e de temperatura (HABULIN; KNEZ, 2001) (Figura 2.6). A possibilidade de alterar o estado físico do  $\text{CO}_2$ , de fluido supercrítico para gás, modificando as condições de pressão e/ou temperatura é bastante interessante para separação de produtos reacionais além de possibilitar a ausência de solvente no produto da reação (THURECHT et al, 2006), permitindo sua reutilização em processos industriais. Além disso, as características decorrentes do estado supercrítico podem aumentar a velocidade de reação e a seletividade do processo (LEITNER, 2000).

Por estas razões a contribuição do  $\text{CO}_2$  supercrítico para a e-ROP de lactonas e lactídeos e seu processamento tem sido muito estudada nos últimos anos (JÉRÔME; LECOMTE, 2008).

A baixa solubilidade de muitos polímeros, incluindo poliésteres alifáticos, em  $\text{scCO}_2$  pode ser uma desvantagem. No entanto, em presença de  $\text{CO}_2$ , a temperatura de transição vítrea e a temperatura de fusão da caprolactona são alteradas. Isso ocorre devido à sorção do  $\text{CO}_2$  no polímero que em geral aumenta com o aumento da pressão (FANOVICH; JAEGER, 2012; TAI et al, 2007). Em atmosfera de  $\text{CO}_2$  uma amostra de policaprolactona de 74.000 Da a 15 MPa funde em temperaturas abaixo de  $40^\circ\text{C}$  (FANOVICH; JAEGER, 2012) enquanto em condições atmosféricas a policaprolactona possui ponto de fusão cristalina variando entre  $59^\circ\text{C}$  e  $64^\circ\text{C}$ . (WOODRUFF; HUTMACHER, 2010). Ao efeito de redução da temperatura de transição do polímero dá-

se o nome de plastificação (TAI et al, 2007). A plastificação, por causar a redução da viscosidade da policaprolactona, auxilia na polimerização uma vez que facilita a difusão do iniciador (neste estudo a água) e do monômero para a fase polimérica.

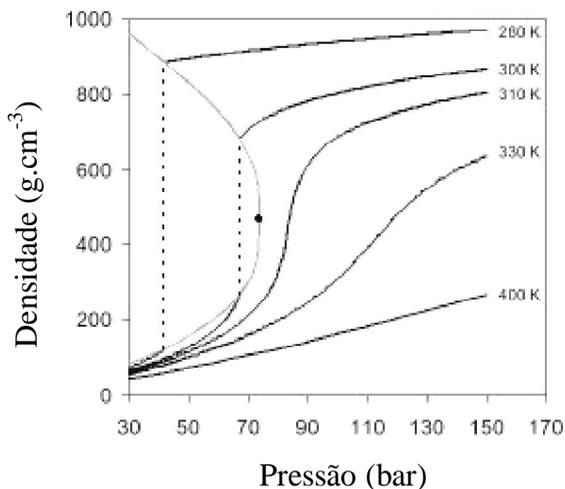


Figura 2.6 - Representação gráfica da variação da densidade do CO<sub>2</sub> puro.  
Fonte: Jacobs (2005)

Vários solventes pressurizados podem ser utilizados como solventes para a polimerização enzimática de  $\epsilon$ -CL. Dentre eles podemos citar o GLP que é um fluido pressurizado que apresenta potencial como solvente para reações de polimerização por abertura do anel, entretanto seu uso ainda é inexplorado. A ANP, através da Portaria 297/2003, classifica o GLP como o conjunto de hidrocarbonetos com três ou quatro átomos de carbono (propano, propeno, n-butano e buteno), podendo apresentar pequenas frações de outros hidrocarbonetos (ANP, 2012). Segundo a Ficha de Informações de Segurança de Produto Químico (FISPQ) do GLP (LIQUIGÁS, 2011) estes compostos devem estar presentes nas seguintes proporções: Propano: 40 - 60 % (v/v); Butano: 40 - 60 % (v/v); Etano e outros hidrocarbonetos mais leves: máx 11% (v/v); Pentano, e outros hidrocarbonetos mais pesados: 0,5 - 2,0 % (v/v).

O GLP (Gás Liquefeito de Petróleo), ou gás de cozinha, que consiste numa mistura gasosa de hidrocarbonetos, como citado acima, é obtido do gás natural das reservas do subsolo ou do processo de refino do petróleo cru nas refinarias (COPAGAZ, 2012). Em 2005, 20% do GLP brasileiro foi obtido do processamento do gás natural e 80% do refino do petróleo (SINDIGÁS, 2012). O Gás natural apresenta baixo teor de contaminantes (nitrogênio, compostos de enxofre, CO<sub>2</sub>, água, particulados) e para sua aplicação como gás combustível é odorizado com enxofre (mercaptanas) para conferir o odor característico (PETROBRÁS, 2012). Em contrapartida o GLP extraído do refino do petróleo não precisa sofrer odorização, pois já possui enxofre em sua composição como impureza, embora necessite de tratamentos de dessulfurização para reduzir estes teores (CRAIDY, 2009). Portanto, o GLP oriundo do gás natural seria o mais adequado para fabricação de produtos com aplicações *in vivo*. Ainda, podem-se empregar processos de purificação para remoção dos compostos sulfurados presentes no gás natural Tennyson e Schaff, 1977 e a GPSA (1987), catalogaram cerca de trinta processos de remoção de H<sub>2</sub>S do gás natural (LOPES, 2003).

As principais vantagens do GLP pressurizado com relação ao CO<sub>2</sub> supercrítico são: seu preço relativamente mais baixo; a observação de que os principais gases que o compõe, propano e n-butano, não apresentam efeito deletério na atividade da enzima, como acontece com o dióxido de carbono supercrítico (HABULIN; KNEZ, 2001; KAO; EKHORUTOMWEN; SAWAN, 1997; OLIVEIRA et al, 2006), além da possibilidade de se operar em pressões mais baixas quando comparado com o CO<sub>2</sub>. Considerando-se o GLP uma mistura equimolar de propano e n-butano, os dois principais gases que o compõe, ele exibe, na condição de 65°C e 25 bar, a densidade de 9,27 mol/l (NIST, 2011), enquanto o scCO<sub>2</sub> só alcança tal densidade em pressão de 124 bar na mesma temperatura (NIST, 2011).

### **2.3.3 Polimerização enzimática envolvendo fluidos pressurizados**

Polimerizações enzimáticas já foram realizadas em CO<sub>2</sub> supercrítico por Loeker et al (2004) e Thurecht et al (2006). Loeker et al (2004) utilizou CO<sub>2</sub> supercrítico, lipase *Candida antarctica* fração B (CALB) e ε-CL para produzir policaprolactona (PCL) com massa molecular (M<sub>n</sub>) de 12000 a 37000 Da, índices de polidispersão de 1,4 a 1,6 e rendimentos de 95 a 98%. Thurecht et al (2006) também utilizaram

CO<sub>2</sub> supercrítico e lipase CALB para estudar a cinética de polimerização  $\epsilon$ -CL, obtendo como resultado PCL com massa molecular ( $M_n$ ) de até 50 kDa e índice de polidispersão da ordem de 2. Segundo a revisão de Albertsson e Srivastava (2008) esta foi a maior massa molecular reportada para polimerização por abertura do anel utilizando enzimas. A falta de controle sobre a massa molecular detectada pelos autores foi atribuída à reações de transesterificação, conforme já observado para e-ROP enzimática em solventes convencionais (THURECHT et al, 2006).

Assim como os estudos de polimerização de PCL catalisadas por lipase, alguns estudos de degradação da policaprolactona também foram realizados. Matsumura et al (2001) relataram que a degradação de PCL catalisada por lipase na presença de CO<sub>2</sub> supercrítico e uma pequena quantidade de água produz oligômeros repolimerizáveis com massa molecular numérica média de cerca de 500 Da. Resultados semelhantes foram obtidos por Takamoto, Uyama e Kobayashi (2001) em CO<sub>2</sub> supercrítico adicionado de acetona. O estudo da repolimerização dos oligômeros obtidos (500 Da) também foi realizado produzindo PCL com  $M_n$  superior a 80.000 Da (expresso em poliestireno) utilizando lipase de *Candida antarctica* (MATSUMURA et al, 2001).

Steinberger et al (1999 apud OLIVEIRA et al, 2006) apontaram que a estabilidade de uma enzima depende da sua estrutura terciária, além de variáveis como temperatura, teor de água no solvente e do número de etapas de pressurização/despressurização .

Rezaei et al (2007) afirma que, dentro da faixa de pressão entre 100 e 400 atm, as reações enzimáticas se tornam menos eficientes à medida que se aumenta a pressão e diminui-se a temperatura do fluido supercrítico. Isso acontece devido à redução no valor das constantes de difusão do substrato (monômero) para os sítios ativos das enzimas, com a elevação da densidade do solvente. Em contrapartida é importante salientar que temperaturas elevadas podem ocasionar a inativação da enzima por desnaturação. A temperatura em que isso ocorre depende das características de cada enzima.

Apesar de o dióxido de carbono ter sido o fluido mais amplamente estudado como meio solvente para reações catalisadas por enzimas (LOEKER et al, 2004, IKUSHIMA et al, 1996; KUMAR; MADRAS; MODAK, 2004; MATSUMURA; OSANAI; TOSHIMA, 2006; VILLARROYA et al, 2006; THURECHT et al, 2006; VILLARROYA et al, 2007), ele pode ter um efeito deletério sobre essas enzimas (HABULIN; KNEZ, 2001; KAO; EKHORUTOMWEN;

SAWAN, 1997; OLIVEIRA et al, 2006). Alguns autores sugerem que a partição da água entre a enzima e o meio circundante (mistura reacional) é um dos fatores determinantes para a queda de atividade das enzimas devido às características hidrofílicas do dióxido de carbono (HABULIN; KNEZ, 2001; KAMAT et al, 1995). O CO<sub>2</sub> pode retirar a água essencial do microambiente da enzima causando sua desativação (HABULIN; KNEZ, 2001). Além disso, as interações entre o CO<sub>2</sub> e a lipase podem ter um efeito negativo sobre a atividade desta. Acredita-se que o CO<sub>2</sub> forme complexos covalentes com os grupos amina livres da superfície da enzima removendo as cargas dos resíduos de lisina, afetando assim a atividade da enzima (KAMAT et al, 1992; KAMAT et al, 1995; HABULIN; KNEZ, 2001). Outra causa é que o CO<sub>2</sub> reduz o pH do meio reacional devido à produção de ácido carbônico pela reação com a água contida na enzima. Baixos valores de pHs podem levar à redução da atividade enzimática (HOBBS; THOMAS, 2007). Ainda, a rápida liberação do CO<sub>2</sub>, dissolvido na água ligada da enzima, devido à diminuição da pressão durante a despressurização do reator pode produzir mudanças na estrutura da enzima. Tais mudanças causam a inativação da enzima e comprometem sua reutilização (NAKAMURA, 1990; LINN et al, 2006). Nas polimerizações enzimáticas muitas lipases de diferentes fontes têm sido aplicadas na síntese de poliésteres. Para a produção de policaprolactona são reportados o uso de lipase de *Candida antarctica*, de *Candida cylindracea*, de *Candida rugosa*, de *Pseudomonas fluorescens*, de *Pseudomonas cepacia* e de lipase de pâncreas suíno, dentre outras (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008). Apesar de a Novozym 435, lipase B de *Candida antarctica* (CALB) imobilizada em Lewatit, sofrer perda de atividade em presença de CO<sub>2</sub> (OLIVEIRA et al, 2006) em reações envolvendo a abertura do anel de caprolactona, o uso da Novozym 435 demonstrou os melhores resultados de rendimento e massa molecular quando comparada com as enzimas acima citadas (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008). Estes resultados foram obtidos com o uso de dióxido de carbono supercrítico como solvente (ALBERTSSON; SRIVASTAVA, 2008; THURECHT et al, 2006).

Além do dióxido de carbono, outros fluidos pressurizados podem ser adequados para biocatálise. Oliveira et al (2006) investigaram a atividade da *Candida antarctica* – fração B submetida a dióxido de carbono, propano e n-butano comprimidos. Foram verificadas perdas para a atividade da Novozym 435 sob tratamento com dióxido de

carbono, enquanto o uso de propano e butano promoveu aumento na atividade da enzima.

Oliveira et al (2006) demonstraram que a exposição da enzima de *Candida antarctica* ao CO<sub>2</sub> promove alterações estruturais na enzima imobilizada, que não ocorrem quando a enzima é exposta ao n-butano. Isso pode ser observado na Figura 2.7 que mostra micrografias eletrônicas de varredura comparando a enzima não tratada com enzimas tratadas em n-butano e em dióxido de carbono (OLIVEIRA et al, 2006).

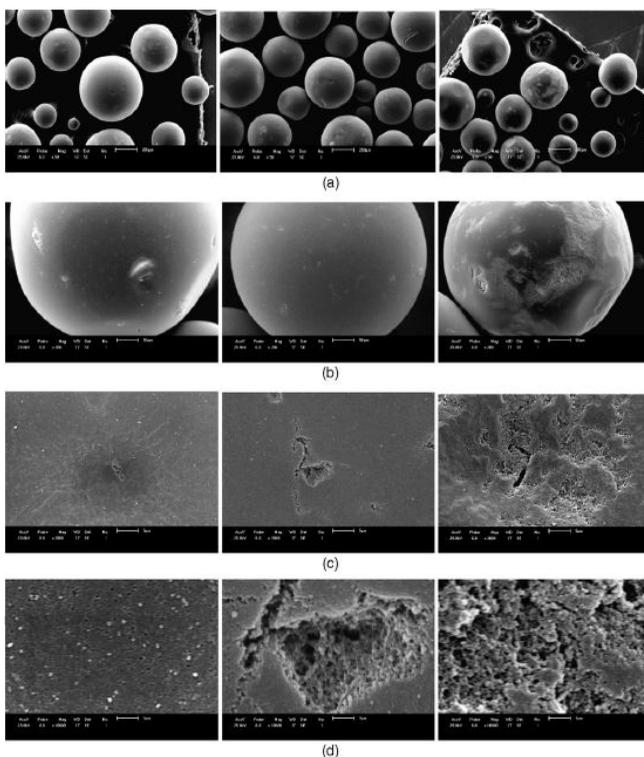


Figura 2.7 - Micrografias eletrônicas de varredura de Novozym 435: (a) amplificação de 50 vezes, (b) amplificação de 200 vezes e (c) amplificação de 2000 vezes e (d) amplificação de 10.000 vezes. Da esquerda para a direita, Micrografias eletrônicas referentes à enzima não tratada, tratada em butano e em dióxido de carbono, respectivamente. Nos dois últimos casos as condições são: temperatura de 75°C, tempo de 6 horas, densidade reduzida de 1,6 e pressão de 276,4 bar. Fonte: Oliveira et al (2006).

Habulin e Knez (2001) afirmam que as atividades de *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus javanicus*, *Rhizopus niveus*, *Candida rugosa* e lipase de pâncreas de porco em propano são maiores do que em CO<sub>2</sub> e atribuem a isso as diferenças de partição da água entre a enzima e o meio. O propano e o butano possuem características hidrofóbicas preservando a água essencial do microambiente da enzima promovendo aumento da atividade enzimática da Novozym 435 (OLIVEIRA et al, 2006). Além disso, a constante dielétrica do propano é baixa. Estudos indicam que a abertura do sítio ativo hidrofóbico da enzima requer uma baixa constante dielétrica (JESSOP; LEITNER, 1999 apud HABULIN; KNEZ, 2001). Fitzpatrick e Klibanov (1991 apud KAMAT et al, 1995) mostraram que a manipulação da atividade e da especificidade da enzima pode ser feita por mudanças na constante dielétrica dos solventes.

### 2.3.4 Reatores

Vários estudos têm sido conduzidos utilizando enzimas imobilizadas e não imobilizadas em dióxido de carbono supercrítico em reatores contínuos e em batelada (RAMSEY, 2009). Não foi encontrado na literatura o uso de reatores de volume variável em reações a alta pressão. A maioria dos estudos relativos à produção de policaprolactona em scCO<sub>2</sub> são realizados em batelada, em reatores/autoclaves de volume constante (BERGEOT et al, 2004; LOEKER et al, 2004; SANTOS et al 2012; STASSIN; HALLEUX; JÉRÔME, 2001; TURECHT et al, 2006)

Nos reatores convencionais, que possuem volume interno fixo, a pressão dentro do reator varia durante a polimerização devido às mudanças de densidade decorrentes da formação das cadeias de polímero (STASSIN; HALLEUX; JÉRÔME, 2000). Além disso, os reatores convencionais geralmente têm espaços com volume representativo onde estão instalados o termopar, o transdutor e a tubulação de amostragem. Nestes locais, a temperatura é influenciada pela temperatura externa, pois não estão em contato com a camisa de aquecimento. O CO<sub>2</sub> sofre grandes variações de densidade com a mudança de temperatura, portanto, nestes sistemas, torna-se difícil ajustar precisamente a razão solvente/ monômero de forma a se calcular a quantidade exata de CO<sub>2</sub> necessária para preencher o reator e alcançar a pressão desejada numa dada temperatura. Por isso, nos reatores convencionais, usualmente se utiliza um quantidade constante de

monômero para todas as reações, sendo o reator preenchido com o solvente para alcançar a pressão na temperatura desejada (BERGEOT et al, 2004; LOEKER et al, 2004; SANTOS et al 2012; STASSIN; HALLEUX; JÉRÔME, 2001; TURECHT et al, 2006). Neste caso, o estudo de diferentes razões de solvente/monômero torna-se difícil. Esta limitação não está presente no reator de volume variável já que não há tubulação de amostragem, o termopar é instalado sem presença de volume morto e o transdutor não é instalado diretamente no reator<sup>3</sup>.

## 2.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE O ESTADO DA ARTE

A comunidade científica tem feito um esforço considerável para promover o desenvolvimento de técnicas e processos que preservem o meio ambiente. Problemas como acúmulo de lixo, com grande contribuição dos polímeros, e contaminação de solo e água por metais pesados são temas constantes na mídia. Assim, parte deste esforço está focado na produção de polímeros biodegradáveis por meio de processos limpos. Além de evitarem o impacto no meio ambiente, os processos “limpos” permitem aplicações que visem à obtenção de produtos de alto valor agregado uma vez que não envolvem o emprego de substâncias tóxicas. Desta forma, aplicações como revestimentos poliméricos de partículas, nanofibras, malhas e *scaffolds* com larga aplicação na indústria farmacêutica, de alimentos e biomédica são possíveis.

O uso de enzimas como catalisadores e de scCO<sub>2</sub> ou GLP pressurizado como solventes são decisões que contribuem para tornar a produção de policaprolactona um processo limpo. Isso ocorre porque as enzimas substituem o uso de espécies metálicas tóxicas como catalisadores da reação de polimerização; e o emprego de fluidos pressurizados como solventes possibilita sua fácil separação da mistura polimérica no momento da despressurização, podendo assim ser reutilizado no processo.

Existem muitos estudos que tratam da produção de policaprolactona. No entanto, poucos fazem uso de solventes pressurizados. Os que existem, referem-se ao emprego de dióxido de

---

<sup>3</sup> Para melhor entendimento da estrutura do reator de volume variável consultar o Capítulo 3: Materiais e métodos.

carbono como solvente (THURECHT et al, 2006; LOEKER et al, 2004; NAKAOKI; KITOH; GROSS, 2005). Em um destes estudos, demonstrou-se que os resultados com este solvente supercrítico podem ser melhores em termos de rendimento e massa molecular dos que os obtidos com o uso solventes orgânicos (THURECHT et al, 2006). Entretanto, nestes estudos não são avaliados separadamente os efeitos de pressão e razão solvente/monômero sobre a reação. Isso foi possível com o uso de um reator de volume variável. Além disso, os estudos encontrados na literatura não abordam a influência da quantidade de catalisador e temperatura sobre a cinética de polimerização, objetos deste trabalho.

O Gás Liquefeito de Petróleo (GLP) e os gases que o compõem como o propano e o n-butano não são abordados na literatura como solventes para reações de produção de poliésteres. No entanto, apesar de exigir cuidados maiores no que se refere ao manuseio e transporte, o GLP apresenta-se como uma alternativa para a diminuição dos custos do processo. Ele apresenta custo menor do que o dióxido de carbono e permite operação em pressões comparativamente mais baixas. O cilindro de GLP tipo P45 que comporta 45 kg de GLP foi cotado a R\$ 198,00 em outubro de 2012 na Gás Express, representante da Ultragás em Florianópolis- SC. O cilindro de 25 kg de CO<sub>2</sub> foi cotado a R\$300,00 na Litoral Gases, representante da White Martins da mesma cidade também em outubro de 2012. Portanto o custo do GLP é de R\$ 4,40/kg contra R\$ 12,00/kg para o CO<sub>2</sub>.

Diante dos aspectos acima citados justifica-se o tema do presente trabalho, que teve como objetivo investigar a produção enzimática de poli- $\epsilon$ -caprolactona em scCO<sub>2</sub> e em GLP pressurizado. Este estudo parte do monômero, da enzima e do solvente pressurizado como matérias-primas, seguindo um caminho de produção de PCL em diferentes condições de processo que culmina na sugestão da melhor condição para realização da reação de polimerização. Inicialmente foi estudada a influência das condições de operação sobre a reação: pressão, razão solvente/monômero e quantidade de catalisador. Tendo como base os resultados da etapa inicial, foram definidas as condições para o estudo da cinética de polimerização, necessárias para a definição do tempo de reação. Introduziu-se também o conceito de produtividade de reação, onde se reúnem os critérios utilizados para avaliação do êxito da reação numa única grandeza. Fazendo-se uso desta variável sugeriu-se a condição para realização dos experimentos de reúso. Esta última etapa

teve a finalidade de se observar a possibilidade de reutilização da enzima no processo de polimerização, fator importante para a redução de custos do processo, uma vez que a Novozym 435 tem um preço elevado, cerca de R\$ 2214,00/kg segundo cotação obtida para compra mínima de 100 kg/ano (NOVOZYMES LATIN AMERICA LTDA, 2012). O monômero  $\epsilon$ -caprolactona custa USD 6.75/kg importado dos EUA no INCOTERM CFR com desova no porto de Itajaí para compra de 16 toneladas (BASF, 2011), ou seja, cerca de R\$13,50/kg sem os impostos de nacionalização que tendem a duplicar o custo.

## 2.5 REFERÊNCIAS

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

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

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

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

ANP. Agência Nacional do Petróleo, Gás Natural e Biocombustíveis. **Portaria ANP Nº 297**, de 18 de novembro de 2003. Diário Oficial [da] União, Brasília, 20 nov. 2003. Disponível em:[http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder\\_portarias\\_anp/portarias\\_anp\\_tec/2003/novembro/panp%20297%20-%202003.xml?f=templates\\$fn=document-frame.htm\\$3.0\\$g=\\$x=\\$nc=8877](http://nxt.anp.gov.br/NXT/gateway.dll/leg/folder_portarias_anp/portarias_anp_tec/2003/novembro/panp%20297%20-%202003.xml?f=templates$fn=document-frame.htm$3.0$g=$x=$nc=8877). Acesso em: 05 de outubro de 2012.

ASTM Standard D883-11, "**Standard Terminology Relating to Plastics**", ASTM International, West Conshohocken, PA, 2011, DOI:10.1520/D0833-11, [www.astm.org](http://www.astm.org).

BASF S.A. Cotação recebida por email em 30 de novembro de 2011.

BENDER, J. P. **Equilíbrio de Fases de Polímeros Biocompatíveis e Monômeros: Dados Experimentais e Modelagem.** Orientado por José Vladimir de Oliveira. Erechim, 2008. 131 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)- Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Departamento de Ciências Agrárias, Programa de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Erechim, 2008.

BERGEOT, V. et al. Anionic ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone in supercritical carbon dioxide: parameters influencing the reactivity. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 28, p. 249–261, 2004.

BINNS, F. et al. Studies leading to the large scale synthesis of polyesters using enzymes. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1 Organic and Bio-Organic Chemistry**. p.2671-2676, 1999.

CALLISTER, W. D. **Ciência e Engenharia de Materiais: Uma Introdução.** 5ed. LTC, São Paulo, 2002.

CANAVEROLO JR., S. V. **Ciência dos Polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros.** Artliber, São Paulo, 2002.

CORDOVA, A. et al. Lipase-catalysed formation of macrocycles by ring-opening polymerisation of  $\epsilon$ - caprolactone, **Polymer Papers**, v.39, 6519-6524, 1998.

COPAGAZ. **O que é GLP?** Disponível em: [http://www.copagaz.com.br/representantes/o\\_que\\_e\\_glp.asp](http://www.copagaz.com.br/representantes/o_que_e_glp.asp). Acesso em: 03 de outubro de 2012.

COULEMBIER, O. et al From controlled ringopening polymerization to biodegradable aliphatic polyester: essentially poly(malic acid) derivatives. **Progress in Polymer Science**, v. 31, p. 723-747, 2006.

CRAIDY, P. S. **Deterioração em Unidade de Tratamento com Dietanolamina- Mecanismos, Consequências e Métodos de Controle.** Porto Alegre, 2009. Orientado por Jane Zoppas Ferreira. 110 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Inspeção de Equipamentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Escola de Engenharia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Porto Alegre, 2009.

DONG, H. et al. Study on the enzymatic polymerization mechanism of lactone and strategy for improving the degree of polymerization. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 37, p. 1265-1275, 1999.

DUDA, A. et al. Kinetics of the ring-opening polymerization of 6-, 7-, 9-, 12-, 13-, 16-, and 17-membered lactones. comparison of chemical and enzymatic polymerizations. **Macromolecules**, v. 35, p. 4266 – 4270, 2002

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

FITZPATRICK, P.; KLIBANOV, A. M. How can the solvent affect enzyme enantioselectivity? **Journal of the American Chemical Society**, v.113, p. 3166-3172, 1991.

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

GEUS, M. **Enzymatic catalysis in the synthesis of new polymer architectures and materials**. Orientado por C.E. Koning . Eindhoven, 2007.131p. Tese (Doutorado) – Technische Universiteit Eindhoven, Eindhoven, Germany, 2007.

GEUS, M. et al. Investigation of factors influencing the chemoenzymatic synthesis of block copolymers. **Macromolecules**, v. 38, p. 4220-4225, 2005.

GPSA. Gas Processors Suppliers Association, **Engineering Data Book**, 10th Ed, Vol II, Sec 21, Hydrocarbon Treating. 1987.

GROSS, R.A.; KUMAR, A.; KALRA, B. In-vitro enzyme catalyzed polymer synthesis. **Chemical Reviews**, v 101, n.7, p. 2097-2124, 2001.

HABULIN, M.; KNEZ, Z. Activity and stability of lipases from different sources in supercritical carbon dioxide and near-critical propane, **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 76, p. 1260-1266, 2001.

HANS, H. et al. Ring-opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactone by means of mono and multifunctional initiators: Comparison of Chemical and Enzymatic Catalysis. **Macromolecules**, v. 39, p. 3184-3193, 2006.

HARRANE, A.; MEGHABAR, R.; BELBACHIR, M. Kinetics of the ring opening polymerization of  $\epsilon$ -caprolactonecatalysed by a proton exchanged montmorillonite clay. **Reactive & Functional Polymers**, v. 66, p. 1696 – 1702, 2006.

HENDERSON, L. A.; SVIRKIN, Y. Y.; GROSS, R. A. Enzyme-catalyzed polymerizations of epsilon-caprolactone - effects of initiator on product structure, propagation kinetics, and mechanism. **Macromolecules**, v. 29, p. 7759-7766, 1996.

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

HUANG, H. et al. Biotin binding-based cell seeding and perfusion culture of liver-derived cells in a porous scaffold with a three-dimensional interconnected flow-channel network. **Biomaterials**, v. 28, p. 3815-3823, 2007.

IGLESIAS, L. E., BALDESSARI, A., GROS, E. G. Lipase-catalyzed chemospecific O-acylation of 3-mercaptoopropanol and 4-mercaptobutanol. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 6, p.853-856, 1996.

IKUSHIMA, Y et al. Promotion of a lipase-catalyzed esterification in supercritical carbon dioxide in the near-critical region. **Chemical Engineering Science**, v. 51, n.11, p. 2817-2822, 1996.

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

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

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

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

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

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

KADOKAWA, J.; IWASAKI, Y.; TAGAYA, H. Ring-opening polymerization of lactones catalyzed by ion-exchanged clay montmorillonite. **Green Chemistry**, v. 4, p. 14 – 16, 2002.

KAMAT, S. et al. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids. I: Optimization of Enzyme Environment. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 40, p. 158-166, 1992.

KAMAT, S. et al. Biocatalytic synthesis of acrylates in organic solvents and supercritical fluids. III. Does carbon dioxide covalently modify enzymes? **Biotechnology and Bioengineering**, v. 46, p. 610, 1995.

KAO, F.-J.; EKHORUTOMWEN, S.A.; SAWAN, S.P Residual stability of lipase from *Candida rugosa* in hexane, supercritical CO<sub>2</sub>, and supercritical SF<sub>6</sub>, **Biotechnol. Tech.**, v. 11, n. 12, p. 849, 1997.

KEREP, P.; RITTER, H. Influence of Microwave Irradiation on the Lipase- Catalyzed Ring-Opening Polymerization of  $\epsilon$ -Caprolactone. **Macromolecular Rapid Communications**, v. 27, p. 707–710, 2006.

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

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

KRICHELDORF, H. R.; KREISER-SAUNDERS, I.; Polylactones 49: Bu<sub>4</sub>Sn-initiated polymerizations of  $\epsilon$ -caprolactone. **Polymer**, v. 41, p. 3957- 3963, 2000.

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

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

KUNDU, S. et al. Continuous flow enzyme-catalyzed polymerization in a microreactor santanu kundu. **Journal of the American Chemical Society**, v. 133, p. 6006–6011, 2011.

LEE, K. H. et al. Characterization of nano-structured poly(epsilon-caprolactone) nonwoven mats via electrospinning. **Polymer.**; v.44, p.1287–1294, 2003.

LEITNER, W. Homogeneous catalysis for application in supercritical carbon dioxide as a green solvent, **Chimie/Chemistry**, v. 3, p. 595-600, 2000.

LIQUIGAZ. **Ficha de Informações do Produto Químico (FISPQ).** Disponível em: <http://www.liquigas.com.br/wps/wcm/connect/a94a95004640d0be8ce7cddd2947447b/FISPQ+GLP+rev+01-11.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso em 10 de julho de 2011.

LIN T. J., CHEN S. W., CHANG A. C. Enrichment of n-3 PUFA contents on triglycerides of fish oil by lipase catalyzed transesterification under supercritical conditions. **Biochemical Engineering Journal** v. 29, p.27–34, 2006.

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

LOPES, F. W. B. **Dessulfurização do Gás Natural Utilizando Sistemas Microemulsionados.** 2003 . Dissertação (Mestrado Em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Departamento de Engenharia Química, Centro de Tecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal – RN, 2003.

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

LOW, S.W. et al. Use of Osteoplug polycaprolactone implants as novel burr -hole covers. **Singapore Medical Journal**, v. 50, n.8, p.777-780, 2009.

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

LUCIANI, A. et al. PCL microspheres based functional scaffolds by bottom-up approach with predefined microstructural properties and release profiles. **Biomaterials**, v.29, p.4800–5807, 2008.

MARRAZZO C., DI MAIO E., IANNACE S. Conventional and nanometric nucleating agents in poly(epsilon-caprolactone) foaming: crystals vs. bubbles nucleation. **Polymer Engineering & Science**, v.48, p.336–344, 2008.