



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

Preparação de filmes a base de quitosana para imobilização de lipase visando a catálise de reações de esterificação

Igor Rafael Brandão Carvalho

Florianópolis
Julho/2016

Igor Rafael Brandão Carvalho

Preparação de filmes a base de quitosana para imobilização de lipase visando a catálise de reações de esterificação

Relatório apresentado ao Departamento de Química
da Universidade Federal de Santa Catarina,
como requisito parcial da disciplina de
Estágio Supervisionado II (QMC 5512)

Orientador: Alexandre Luis Parize
Co-orientadora: Maria da Graça Nascimento

Florianópolis
julho/2016

Igor Rafael Brandão Carvalho

Preparação de filmes a base de quitosana para imobilização de lipase visando a catálise de reações de esterificação

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Coordenador de Estágio do Curso de Química-Bacharelado

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Luis Parize
Orientador

Prof. Fábio Zazyki Galetto
DQ-UFSC

Prof.^a Vanderleia Gava Marini
DQ-UFSC

Florianópolis
julho/2016

Dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas, a minha amada mãe Selene Brandão e meu querido irmão Francys Campelo meus melhores e maiores presentes...

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho a todos que de alguma forma contribuíram para o desfecho de mais esta etapa de minha vida.

Primeiramente a Deus;

À minha mãe Selene Brandão que sempre abriu mão dos seus sonhos para realizar os meus;

Ao meu irmão Francys Campelo que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, apesar da distância, dando as mais belas palavras de motivação;

À Universidade Federal de Santa Catarina, pelo apoio institucional e pelo ensino de qualidade;

Ao prof. Dr. Alexandre Luis Parize pela dedicação, confiança e paciência que teve comigo;

À prof^a Dra. Maria da Graça Nascimento pelo incentivo, empenho, dedicação e compreensão;

Ao CNPq, Capes e INCT-catálise, pelo suporte e apoio financeiro;

À Amano pela doação da lipase;

Aos colegas do Laboratório de Biocatálise, pela companhia e auxílio nas análises.

Aos colegas do Laboratório POLIMAT, pela companhia e pelo auxílio, especialmente aos colegas Idejan e Samuel por terem me ensinado a manusear os equipamentos e a interpretar as análises.

À central de análise do Departamento de Química e do Departamento de Engenharia Química, pelas análises necessárias para este trabalho.

Aos professores da UFSC, que de alguma forma colaboraram para esta conquista.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO	iv
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 Biopolímeros	2
2.2 Propriedades e estrutura da quitosana	2
2.3. Filmes poliméricos de quitosana	4
2.4. Imobilização de enzimas	5
2.5 - Lipases	6
2.6 Ésteres de cadeias longas.....	8
3. OBJETIVOS	10
3.1 Objetivo Geral	10
3.2 Objetivos Específicos	10
4. METODOLOGIA	11
4.1 Materiais.....	11
4.2 Equipamentos	11
4.3 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)	12
4.4 Preparação do filme de quitosana puro.....	12
4.5 Preparação do filme de quitosana com lipase	12
4.6 Preparação do meio reacional para as reações de esterificação.....	13
4.7 Espectroscopia no infravermelho	14
4.8 Ensaio tensão-deformação dos filmes	15
4.9 Análise dínamo-mecânica dos filmes - DMA.....	15

4.10 Determinação do ângulo de contato	15
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	16
5.1- Determinação do grau de desacetilação da quitosana	16
5.2 - Preparação e caracterização dos filmes	17
5.3 Caracterização dos filmes por infravermelho(IV)	19
5.4 - Determinação do Ângulo de contato.....	20
5.6 - Ensaio dínamo-mecânico dos filmes de QTS e QTS/LPS	24
5.7 - Reação de esterificação com a LPS-SD imobilizada	27
5.8 - Caracterização espectroscópica dos produtos da reação	29
6. CONCLUSÕES	33
7. REFERÊNCIAS BLIBLIOGRÁFICAS	34
8. ANEXOS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura da quitosana (a) quitina (b) e celulose (c). ³	3
Figura 2. Filme de quitosana feito com ácido acético	4
Figura 3. Métodos de imobilização de enzimas: (A) aprisionamento, (B) encapsulação, (C) suporte sólido-adsorção, (D) reticulação - ligação cruzada. ¹⁰	6
Figura 4. Reações genéricas de esterificação e hidrólise	7
Figura 5. Reação de Esterificação	13
Figura 6. Espectro de ¹ H-RMN do Laurato de n-propila(91%) e do n-propanol(9%)[CDCl ₃ , 400MHZ]	14
Figura 7. Espectro de infravermelho da quitosana(KBr)	16
Figura 8. Espectro de infravermelho dos filmes de QTS (a), QTS/LPS-SD (b) e LPS(c)	19
Figura 9. ângulo de contato para água em Filmes de QTS(a) e de QTS/LPS(b)	20
Figura 10. Ensaio mecânico do filme de QTS	22
Figura 11. Ensaio mecânico do filme de QTS/LPS-SD	23
Figura 12. Módulo de perda para os filmes de QTS/LPS-SD (a) e QTS (b)	25
Figura 13. Módulo de estocagem para os filmes de QTS/LPS-SD (a) e QTS (b)	26
Figura 14. Tan Delta para os filmes de QTS/LPS-SD (a) e QTS (b)	26
Figura 15. Caracterização do laurato de n-propila por ¹ H-RMN [CDCl ₃ , Varian ¹ H-RMN 400 MHz]	30
Figura 16. Espectro de IV do ácido láurico (a) e do Laurato de n-propila (b)	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Aspecto macroscópico dos filmes de quitosana.	18
Tabela 2. Ângulo de contato entre o filme e a gota de água.....	21
Tabela 3. Dados referentes ao ensaios de tensão - deformação dos filmes.	23
Tabela 4. Conversão ao laurato de n-propila e ao laurato de n-butila. ^(a)	28

LISTA DE ABREVIATURAS

ccd: cromatografia em camada delgada
DMA: análise dínamo-mecânica
GD: grau de desacetilação
¹H-RMN: ressonância magnética de hidrogênio
IV: Infravermelho
LPS-SD: lipase de *Burkholderia cepacia*
PBS: poli(succinato de butileno)
PCL: policaprolactona
PET: polietileno tereftalato
pH: potencial hidrogeniônico
PHA: polihidroxicanoato
PHB: polihidroxi butirato
PLA: poliácido lático
POS: polisiloxano
PVA: ácido polivinílico
PVC: cloreto de polivinil
QTS: quitosana
Rf: fator de retenção
Tg: transição vítrea
TGA: termogravimetria

RESUMO

Este estudo tem como objetivo preparar filmes poliméricos à base de quitosana para imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) visando catálise na preparação do laurato de *n*-propila e o de *n*-butila por reação de esterificação do ácido láurico com *n*-propanol e *n*-butanol, respectivamente.

Os filmes foram preparados por técnica de *casting*, partindo-se de uma solução polimérica de quitosana com a adição da LPS-SD (20mg - 40mg) deixada secar, e cortados em pedaços pequenos e regulares. Posteriormente, estes sistemas foram utilizados como catalisadores em reações de esterificação. Foram testados o uso de filmes com diferentes espessuras de acordo com a concentrações de quitosana, 1%(m/V) - 2%(m/V), massa de LPS-SD e tempos de reação visando obter os ésteres em boas conversões. Análises de ¹H-RMN, IV e ccd comprovaram a formação dos ésteres, havendo conversões de 91% para o laurato de *n*-propila e 28% para o laurato de *n*-butila.

Para as amostras obtidas foram avaliadas as propriedades mecânicas como ensaio de tensão-deformação e análise dínamo-mecânico, determinação do ângulo de contato com água e FTIR que demonstraram que a adição de LPS-SD aos filmes acarreta mudança nas suas propriedades dos sistemas obtidos.

Observou-se que os materiais obtidos possuem características importantes na catálise de reações de esterificação de ésteres de cadeia longa.

Palavras-chave: lipase, quitosana, imobilização, reação de esterificação.

1. INTRODUÇÃO

A utilização de agentes biológicos para a catálise de reações está em constante crescimento, pelo fato destes processos apresentarem ganhos consideráveis quanto à eficiência catalítica, como as enzimas do tipo lipase que catalisam reações de esterificação e de transesterificação na produção de ésteres de cadeias longas como flavorizantes, lipídeos estruturados e biocombustíveis.

No campo industrial, com o passar do tempo, estas enzimas adquiriram uma relevância devido ao seu custo relativamente baixo, especificidade e capacidade de reuso. Embora possuam excelentes vantagens devido as suas características, estas apresentam uma certa fragilidade quanto a fatores químicos, físicos ou biológicos capazes de inativarem o seu efeito.

Visando melhorar a utilização das enzimas em ambientes desfavoráveis, técnicas de imobilização em diferentes suportes são otimizadas com o intuito de evitar a inativação da enzima, proporcionar a sua reutilização, proteger frente a microorganismos como fungos e bactérias e garantir estabilidade em relação ao solvente orgânico, temperatura e pH.

Uma alternativa, neste contexto, é o uso de filmes poliméricos a base de quitosana que asseguram estas propriedades devido as suas qualidades biológicas: por ser atóxico, resistente a micro-organismos, biocompatível e biodegradável. Estes são constituídos de uma fonte renovável, podendo ser utilizados nas diferentes técnicas de imobilização, como aprisionamento, adsorção, encapsulação e reticulação em suas diferentes formas como filmes, esferas e géis.

A vasta capacidade de atuação deste biopolímero para a imobilização de enzimas, incluindo as lipases, garantem o objetivo deste trabalho na preparação de ésteres de cadeia longas, com ênfase na preparação de filmes a base de quitosana para a fixação da enzima.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Biopolímeros

Biopolímeros são polímeros ou copolímeros naturais e biodegradáveis (proteínas, polissacarídeos, DNA, RNA e etc.), obtidos a partir de matérias primas biológicas, de fontes renováveis e produzidas por um organismo vivo.¹

Polímeros biodegradáveis podem ser classificados em quatro categorias de acordo com a fonte e síntese: polímeros advindos da biomassa, como polissacarídeos (amido de batatas, milho, trigo), proteínas e lipídios (caseína do soro do leite, colágeno); polímeros obtidos por síntese microbiana tais como os polihidroxialcanoatos (PHA) e polihidroxibutirato (PHB) através da fermentação de açúcares; polímeros sintetizados quimicamente a partir de monômeros oriundos de agro-recursos como poliácido lático (PLA) e os sintetizados quimicamente cujo os monômeros são obtidos de fontes não-renováveis como as fósseis, como por exemplo as policaprolactonas (PCL) e poli(succinato de butileno) (PBS).¹

Observa-se um aumento no uso de polímeros naturais biodegradáveis, como a quitosana, por serem potenciais substituintes dos artificiais oriundos de fontes não-renováveis, sendo amplamente descritos na literatura devido as suas numerosas características biológicas.¹

2.2 Propriedades e estrutura da quitosana

A quitosana (Fig. 1a) é um polissacarídeo natural (formado pela sequência do monômero de D-Glucosamina), principal derivado da quitina (Fig. 1b), e esta substância é encontrada nos exoesqueletos de insetos, conchas de crustáceos e parede celular de fungos. É produzida pela N-desacetilação da quitina e análogo à celulose (Fig. 1c), em que o grupo hidroxila (OH) presente no carbono 2 é substituído pelo grupo amino (NH₂) (**Figura1**).²⁻³

O fato de ser obtido através da quitina, o grau de pureza da quitosana, necessário para a obtenção de um produto solúvel, é determinado pelo grau de desacetilação do grupo amino, onde o produto final da reação é um copolímero

formado tanto por unidades de D-glucosamina quanto por N-acetil D-Glucosamina, com grau de 80%-85%.³

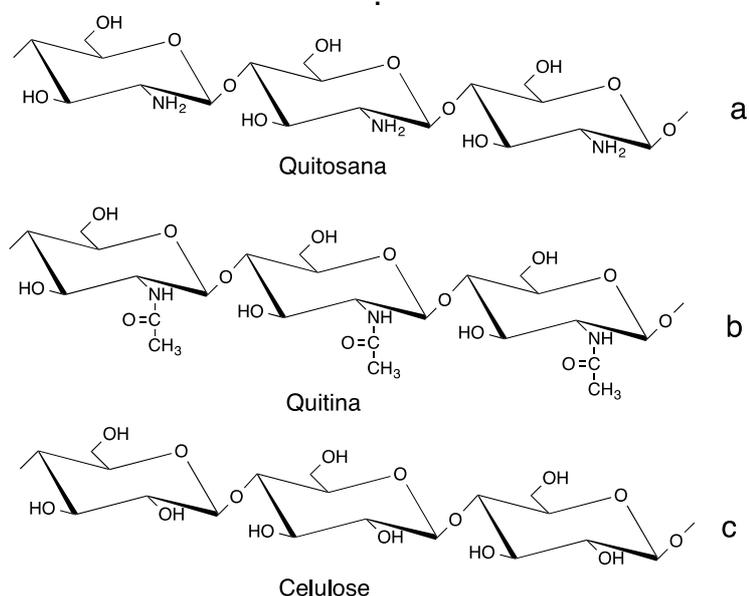


Figura 1. Estrutura da quitosana (a) quitina (b) e celulose (c).³

De acordo com a estrutura da quitosana, e devido à baixa polaridade, tende a ser insolúvel em água, mas solúvel em pH relativamente ácido, abaixo ou em torno de pH 6,5, nos quais os grupos aminos estão protonados ($-\text{NH}_3^+$).³

A quitosana tem apresentado potencial para diversas aplicações na medicina, cosméticos, agricultura, tratamento de água, engenharia de tecidos e sistemas de liberação controlada de drogas, entre outras, sendo utilizada na forma de filmes, géis, esferas, micro/nanopartículas e em membranas.^{3,4}

Considerando os diversos suportes utilizados para imobilização de enzimas, naturais ou sintéticos, tanto orgânicos como inorgânicos, a quitosana é um composto interessante para este fim, devido as suas propícias características, tais como ser biocompatível, atóxico, biodegradável e resistente ao ataque de micro-organismos, podendo ser utilizada na preparação de géis, esferas ou membranas, alta porosidade, hidrofiliidade e alta afinidade com proteínas, sendo estudada como um potencial material biológico na área medicinal.³

Desta forma, considerando suas características químicas e biológicas bem como a facilidade na preparação de suportes sólidos, filmes de quitosana se tornaram úteis na imobilização de enzimas.

2.3. Filmes poliméricos de quitosana

Nas últimas décadas, materiais à base de quitosana foram preparados e potenciais produtos foram desenvolvidos em diversas áreas com o objetivo de garantir uma maior eficiência em determinada atividade, como no tratamento de águas residuais, na indústria alimentícia, agricultura, indústria de papel e celulose, na área medicinal e biotecnológica.³

As suas notáveis características asseguram-na como um suporte ótimo para imobilização de enzimas podendo ser utilizada na forma de pó, flocos, géis, filmes, membranas, esferas e etc.³

Os filmes poliméricos de quitosana na forma de membranas vem sendo bastante estudado devido a sua grande capacidade de suporte para diversos tipos de enzimas, células ou fármacos, em técnicas de aprisionamento e imobilização.⁵⁻⁶

(Figura 2)

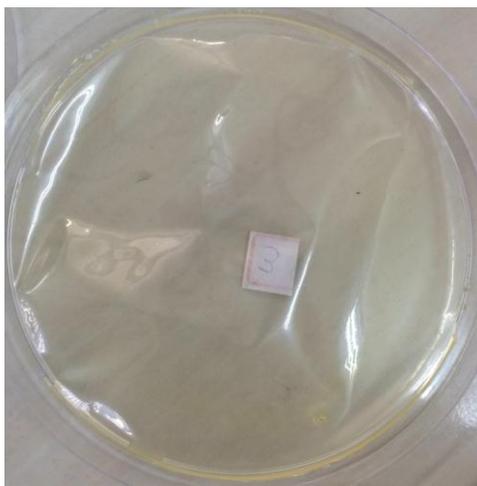


Figura 2. Filme de quitosana feito com ácido acético

As suas características favoráveis, tanto biológicas quanto químicas, asseguram o seu desempenho em diversas áreas, tais como na indústria alimentícia, auxílio na produção de bebidas alcoólicas através da imobilização de células para fermentação e processamento contínuo segundo proposto por Kourkoutas e col.⁷, na biomedicina, onde a biocompatibilidade é essencial, como no transporte e liberação controlada de fármacos no organismo humano através do aprisionamento do

mesmo⁴, e na preparação de filmes poliméricos para imobilização de enzimas através da combinação com polímeros sintéticos.⁵

Além das características gerais que estão relacionadas ao próprio biopolímero, é possível variar certas propriedades relacionadas ao filme feito com este biomaterial através do uso de solventes utilizado na preparação de quitosana. Por exemplo, o uso de ácido acético resulta em filmes flexíveis, transparentes, sem características adesivas e com superfícies brilhante; os filmes obtidos com ácido cítrico apresentam-se ligeiramente quebradiços e com coloração amarelada, sendo flexíveis e não adesivos. O uso de plastificantes (como glicerol e sorbitol) pode tornar estes sistemas mais flexíveis.⁶

Como citado, os filmes de quitosana podem ser usados para imobilização de enzimas, incluindo as lipases que foram usadas neste trabalho.

2.4. Imobilização de enzimas

A imobilização é uma técnica de fixação de enzimas em suportes sólidos, de forma a mimetizar o modo de aprisionamento natural feito em células vivas, mais precisamente, na membrana celular, onde este sistema tende a estabilizar a estrutura da enzima e sua atividade, garantindo maior resistência aos efeitos externos.

As enzimas imobilizadas, em geral, asseguram um processo rápido para o término de uma reação, garantem a recuperação, tanto da enzima quanto do produto, proporcionam o seu uso em múltiplos ciclos de reação, sem perder de forma significativa a sua capacidade de atuação, além de obter um aumento no desempenho catalítico e possibilitar o uso da enzima em um meio orgânico. A utilização de uma enzima imobilizada como catalisador de reações, permite simplificar o processo reacional envolvendo a fixação ou dispersão de uma enzima em um suporte insolúvel para obter um sistema heterogêneo.^{3,9}

As enzimas podem ser imobilizadas por vários métodos, baseados no tipo de interação entre a enzima e o suporte, podendo ser física, onde há uma interação mais fraca, como uma adsorção, e química onde há a formação de ligação covalente. Dentre os métodos físicos destacam-se o aprisionamento em gel (inclusão),

microencapsulação em membrana sólida e adsorção física ou iônica. Dentre os métodos químicos, cita-se a reticulação (ou crosslinking), com a utilização de um reagente multifuncional de baixa massa molar e co-reticulação com outro componente neutro, como uma proteína.^{3,10}

A **Figura 3** mostra alguns dos principais métodos de imobilização de enzimas.¹⁰

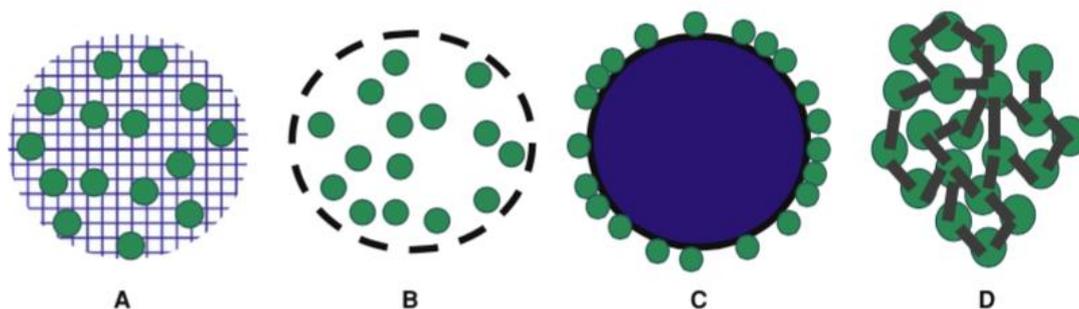


Figura 3. Métodos de imobilização de enzimas: (A) aprisionamento, (B) encapsulação, (C) suporte sólido-adsorção, (D) reticulação - ligação cruzada.¹⁰

Apesar da grande variedade de métodos para imobilização, nenhum por si só é o melhor para todas as enzimas. Isto ocorre pelo fato de haver uma heterogeneidade entre uma e outra, em relação à composição, propriedades do substrato e do produto, e meio de atuação. Além da diferença entre os métodos, onde uns podem ser mais simples que os outros, mais custosos, mais efetivos, reversíveis e duráveis.³

Portanto, para melhor escolha das condições de imobilização de determinada enzima, deve-se adotar de forma empírica e através de um processo de tentativa e erro, os diversos parâmetros, de modo a assegurar a máxima retenção, atividade, durabilidade e estabilidade possíveis da enzima.¹⁰

2.5 - Lipases

As lipases são catalisadores biológicos que atuam sobre lipídeos em reações químicas, como em reações de esterificação, em que há a formação de um éster a partir de um ácido carboxílico e um álcool, e em reações de hidrólise (contrária à

reação de esterificação) como o que ocorre no corpo humano, onde, no sistema digestivo, as gorduras são convertidas em ácidos graxos e glicerol (**Figura 4**).¹¹

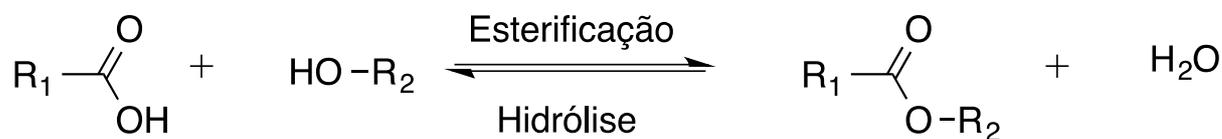


Figura 4. Reações genéricas de esterificação e hidrólise

A lipase é a classe de enzimas mais utilizada em biotecnologia, por serem mais estáveis devido à sua evolução estrutural do que as estereases. São aplicadas preferencialmente na hidrólise de gorduras, devido a sua especificidade para substratos de cadeias carbônicas longas, como na hidrólise de ésteres de ácidos graxos. Com o passar do tempo, ganharam uma relevância significativa devido à sua particularidade em reações sintéticas de esterificação e transesterificação ocorridas em meio orgânico ou de baixa concentração aquosa na produção de ésteres como flavorizantes, potenciais fármacos e biocombustíveis no meio industrial.^{12,13}

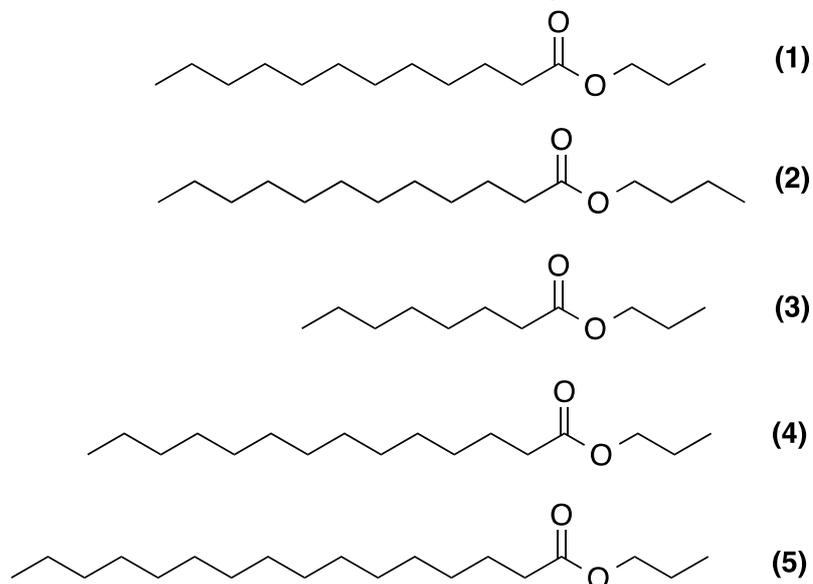
Na indústria, as lipases imobilizadas demonstram seu maior potencial, como na indústria de óleos, na produção de sabão, detergentes e cosméticos a partir da hidrólise de óleos naturais como azeite de dendê e de oliva, como proposto por Shamel e col.¹⁴. Outras aplicações são para o enriquecimento de triglicerídeos com ácidos graxos poli-insaturados como proposto por Huanf e col.¹⁵, na produção de biodiesel a partir da alcoólise de óleos naturais como proposto por Tan e col.¹⁶, na indústria alimentícia, na preparação de flavorizantes e lipídeos estruturados¹⁷, na produção de potenciais fármacos como proposto por Yu et al¹⁸. As lipases também vem sendo usadas para preparar ésteres isoméricos do ácido linoleico possuindo boas funções farmacológicas¹⁹, bem como na indústria de cosméticos como na produção de ésteres antioxidantes, biossurfactantes, flavorizantes e emolientes.²⁰

A técnica da imobilização da lipase combinada à sua eficiência permite o aumento o tempo de vida de atuação, recuperação, reutilização, e a proteção frente ao solvente, temperatura e agentes externos, como bactérias e fungos, devido à cooperação enzima-suporte, onde as características de uma são praticamente transferidas à outra.^{9,12}

2.6 Ésteres de cadeias longas

Ésteres são compostos orgânicos naturais, onde muitos são glicerídeos, provenientes da glicerina, que constituem a maior parte dos óleos e gordura. Ésteres mais simples, formados por cadeias mais curtas de carbono são responsáveis pelo aroma de frutas e flores sendo utilizados na indústria como flavorizantes e aromatizantes de bebidas. Por exemplo, citam-se o butanoato de *n*-butila (aroma de abacaxi), metanoato de etila (aroma de groselha) e o etanoato de butila (aroma de maçã verde).²¹

Os ésteres de cadeias longas a serem preparados neste trabalho por catálise enzimática são os dodecanoato de *n*-propila(1) e o de *n*-butila(2), a partir de ácidos graxos de cadeias longas e álcoois de cadeia curta (*n*-propanol e *n*-butanol); estes derivados de ácidos graxos reportados na literatura bem como os octanoato de *n*-propila(3), miristato de *n*-propila(4) e palmitato de *n*-propila(5), são comumente utilizados na indústria como aditivos, plastificantes de PVC e em formulações de produtos cosméticos e farmacêuticos como cremes, protetores solares e pomadas.²²



Trabalhos recentes utilizando lipases imobilizadas em polímeros como proposto por Oliveira et al.,²³ demonstram a capacidade de atuação das lipases em reações de esterificação, onde as do tipo microbiana imobilizadas em copolímero de estireno-divinilbenzeno foram utilizadas na preparação do butirato de *n*-butila, com conversão de 95% a 37°C em 24h.

No trabalho proposto por Paula et al.,²⁴ a preparação de ésteres de açúcares, usando o ácido láurico e frutose com conversão de 44% por 6 h, foi feita usando lipase pancreática do porco (PPL) imobilizada em partículas de polisiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA).

Portanto, devido ao grande interesse na utilização de lipases imobilizadas utilizadas como catalisadores, neste estudo será preparado um novo suporte a base quitosana para ser usado na imobilização da LPS-SD. Posteriormente, este sistema será usado em reações de esterificação para obtenção de ésteres de cadeias longas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este estudo visa preparar filmes de quitosana pela técnica de casting com intuito de serem usados como suporte na imobilização da lipase LPS-SD, obtendo sistemas catalíticos com potencial aplicação em reações de esterificação do ácido láurico com *n*-propanol e *n*-butanol, em meio orgânico.

3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a quitosana e avaliar as melhores condições de obtenção dos filmes puros e dos filmes de quitosana contendo lipase LPS-SD, tais como concentração e volume da solução polimérica e resistência do filme.
- Caracterizar os filmes de quitosana puros e contendo a enzima lipase por espectroscopia no infravermelho, análise de tensão-deformação, ensaio dinamo-mecânico e determinação do ângulo de contato.
- Avaliar a influência da imobilização da lipase na reação de esterificação entre o ácido láurico com *n*-propanol e *n*-butanol.
- Caracterizar por infravermelho (IV) e quantificar a obtenção dos ésteres por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (¹H-RMN) e determinar a pureza por cromatografia em camada delgada (ccd).
- Comparar os resultados obtidos com os presentes na literatura.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais

- Quitosana de média massa molar proveniente da Sigma Aldrich (99%)
- Lipase de Bactéria *Burkholderia cepacia* - LPS-SD (Amano, 30.000 u/g)*

* Uma unidade de atividade lipolítica está definida como a quantidade de enzima que libera um μmol de ácidos graxos por minutos. Como substrato é utilizado o óleo de oliva. ** Uma unidade de atividade lipolítica hidrolisa 1 $\mu\text{equivalente}$ de ácido graxo a partir de triglicerídio em 1h, pH 7,7, A 37 °C.

- Hexano (Synth, 98,5%), Álcool propílico (Nuclear, grau analítico), Álcool Butílico (Vetec, grau analítico), Ácido Láurico(Vetec, 98%).

4.2 Equipamentos

- Espectrômetro de ^1H -RMN (Varian AC 400F, 400MHz);
- Espectrômetro de infravermelho (Shimadzu IR Prestige 21);
- Agitador com banho termostatizado (Technal TE-0532);
- Rota-evaporador (Buchi 461);
- Máquina de ensaio mecânico (EMIC DL 2000);
- Máquina de análise dínamo-mecânica (DMA - Q800);
- Goniômetro (Ramé-Hart Instrument - 190)

Estes estão disponíveis nos laboratórios POLIMAT 201/202 e de Biocatálise 301/302, na Central de Análises do Departamento de Química e de Engenharia Química da UFSC.

4.3 Determinação do grau de desacetilação da quitosana (%GD)

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por espectroscopia no infravermelho. O espectro de infravermelho de amostras sólidas de quitosana na faixa de 4000-400 cm^{-1} foi realizado em pastilhas de KBr, com resolução de 4 cm^{-1} , por meio da acumulação de 25 escaneamentos em um espectrômetro IR Prestige-21 Shimadzu.

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado pela **Equação 1**:

$$\%GD = 100 - \frac{(A_{1320}/A_{1420}) - 0,3822}{0,03133} \quad \text{Equação 1}$$

onde %GD é o grau de desacetilação; e A_{1320} e A_{1420} são as intensidades de absorção no infravermelho em 1320 e 1420 cm^{-1} , respectivamente.

4.4 Preparação do filme de quitosana puro

Os filmes de quitosana foram obtidos a partir de uma solução polimérica de quitosana 2% (m/v) *via* técnica de *casting*. 2g de quitosana foram dissolvidas em 100mL de uma solução 0,2 mol.L^{-1} de ácido acético e agitada por 24 h a temperatura ambiente. Após solubilização total da quitosana e obtenção de uma solução viscosa, esta foi filtrada em funil de placa porosa para a retirada de quitina presente. Posteriormente, 50 mL desta solução foram colocados em uma placa de polietileno tereftalato (PET) e deixados em uma superfície nivelada para evaporação do solvente. Após a secagem, os filmes foram acondicionados para as devidas análises.

4.5 Preparação do filme de quitosana com lipase

A preparação dos filmes contendo lipase, foi realizada seguindo o procedimento descrito no item anterior. Após a obtenção da solução viscosa de quitosana, 20 mg da lipase LPS-SD foi dissolvida em 2 mL de tampão tris pH 7,2 e adicionada à solução de quitosana. Após a adição da lipase, a solução permaneceu

sob agitação por 60 min até a completa homogeneização do sistema. A solução final foi colocada em placa de PET e deixada para secar à temperatura ambiente em uma superfície nivelada. Após secagem, o filme esteve pronto para a análise e para a reação de esterificação.

4.6 Preparação do meio reacional para as reações de esterificação

O filme seco de quitosana/LPS-SD foi cortado em pequenos pedaços, com o intuito de garantir uma boa área superficial e colocados em um erlenmeyer contendo 50 mL de *n*-hexano, como solvente da reação, ácido láurico (5 mmol), *n*-propanol ou *n*-butanol (5 mmol) e agitado em banho termostatizado da Technal TE-0532, a 35° C por 24 h. (**Figura 5**)

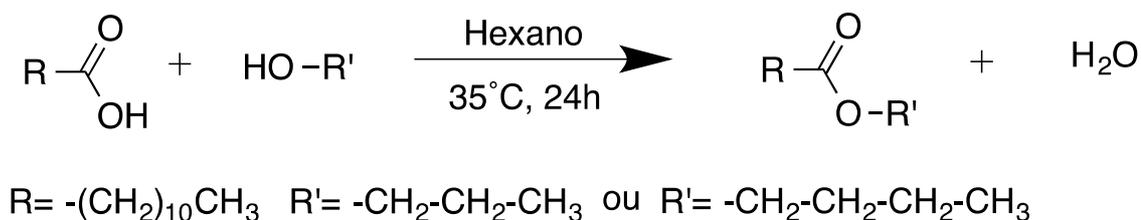


Figura 5. Reação de Esterificação.

A reação foi monitorada por cromatografia em camada delgada (ccd), usando uma solução hexano:acetato de etila (7:3 v/v) como eluente. Após o término da reação, a mistura foi separada do filme e transferida para um balão de fundo redondo.

O filme foi lavado com o solvente orgânico da reação, de forma abundante, com o intuito de garantir a retirada de todos os reagentes e produto, sendo avaliado também por ccd. A seguir, o solvente foi removido do balão de fundo-redondo por rota-evaporador..

A formação do produto foi quantificada por análises de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio, ^1H -RMN, em que a conversão é calculada pela comparação de área entre os hidrogênios metilênicos do álcool ($\delta \sim 3,5$ ppm) com os dos hidrogênios metilênicos vizinhos ao éster ($\delta \sim 4,0$ ppm), dividindo-se a área referente aos prótons vizinhos ao éster pela soma das áreas dos picos relacionados, como apresentado na **figura 6**, para o laurato de *n*-propila e *n*-propanol (produto de reação

não purificado). A caracterização foi também determinada por espectroscopia no infravermelho (IV) e a pureza do produto por ccd.

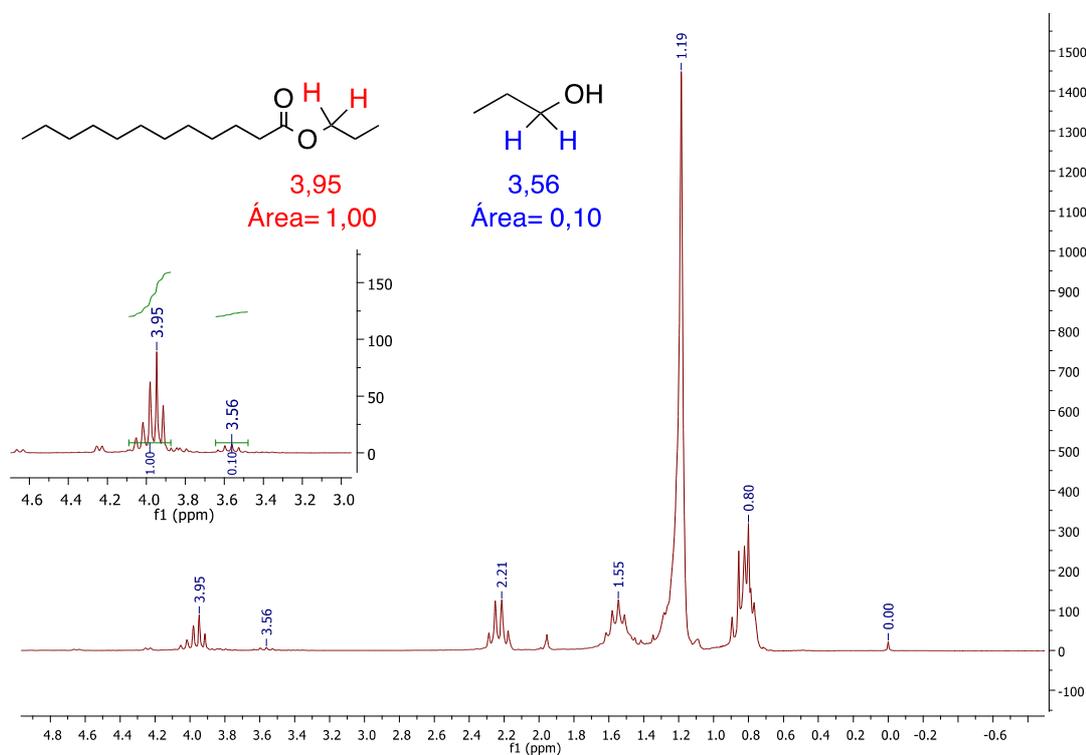


Figura 6. Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do Laurato de n-propila(91%) e do n-propanol(9%)[CDCl_3 , 400MHZ].

4.7 Espectroscopia no infravermelho

Análises de espectroscopia na região do infravermelho, dos filmes, foram obtidas utilizando-se um espectrofotômetro Shimadzu IR Prestige 21. As soluções filmogênicas foram desidratadas em superfícies de silício para a formação de filmes finos e posteriormente analisadas. O produto da reação de esterificação foi analisado via aparato de ATR-FTIR. Sendo obtidos 32 scans na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1}

4.8 Ensaio tensão-deformação dos filmes

Os ensaios de tensão-deformação têm como objetivo determinar as propriedades mecânicas dos materiais, como módulo de elasticidade, tensão máxima, deformação específica, tensão de escoamento, entre outros.

Foram obtidos corpos de prova (12,5 x 50 mm) a partir dos filmes produzidos e analisados em ensaios de tensão-deformação. Os corpos de prova foram acondicionados em umidade relativa de 58% (dessecador com solução saturada de brometo de sódio) à temperatura de 25 °C, durante 48 horas. Os ensaios foram realizados utilizando um equipamento de ensaio universal, EMIC DL 2000 à temperatura ambiente com velocidade constante de 20 mm.min⁻¹, uma célula de carga igual a 50 kgf e distância inicial da prova de 50mm. As medidas foram realizadas segundo a norma ASTM D882-00 (2001).²⁵ Os resultados obtidos correspondem a uma média no ensaio de 10 corpos de prova para cada filme analisado.

4.9 Análise dínamo-mecânica dos filmes - DMA

Corpos de prova com uma média de 5,33 x 70 mm foram recortados do filme de QTS e QTS/LPS, acondicionados em uma umidade relativa de 58%, à temperatura de 25 °C, por 48 horas e feito o ensaio em um equipamento de análise dínamo-mecânica, DMA Q800 a uma faixa de temperatura de 30 a 200 °C, com uma taxa de 1 °C/ min. Para cada amostra foi feita análise de 4 corpos de prova.

4.10 Determinação do ângulo de contato

Para realizar as medidas de ângulo de contato, foi utilizado o software Drop Image Advanced que é acoplado ao Goniômetro Ramé-Hart Instrument 190, utilizando uma câmera para observar a imagem do perfil da gota através da obstrução dos feixes de luz.

Foram realizadas 10 medidas do ângulo de contato em cada gota de água, de aproximadamente, 5 µL, em intervalos de 1 segundo. A análise foi realizada em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste trabalho, a lipase de Bactéria *Burkholderia cepacia* (LPS-SD) foi imobilizada em filmes de quitosana. Estes suportes, com a enzima imobilizada, foram utilizados em reações de esterificação para obtenção de ésteres de cadeia longa, laurato de n-propila e laurato de n-butila.

Os filmes utilizados foram analisados por ensaios mecânicos, infravermelho (IV) e ângulo de contato de forma a observar mudanças promovidas pela enzima após imobilização.

A seguir, os resultados obtidos serão apresentados e discutidos.

5.1- Determinação do grau de desacetilação da quitosana

O grau de desacetilação(GD) da quitosana foi determinado, primeiramente, por espectroscopia de infravermelho, cujo espectro obtido encontra-se na **Figura 7**.

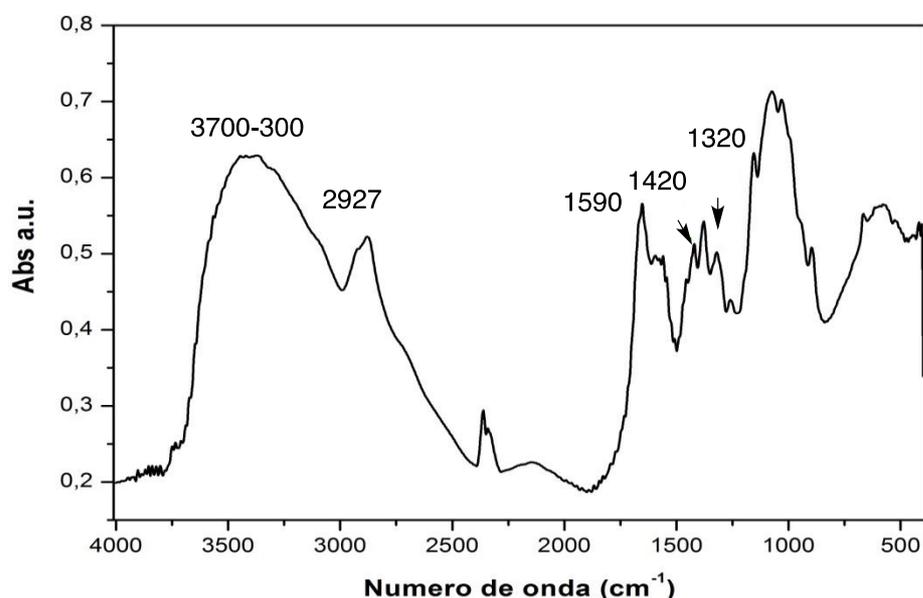


Figura 7. Espectro de infravermelho da quitosana(KBr).

Muitas bandas características podem ser observadas neste espectro, tais como uma banda larga entre 3700 e 3000 cm^{-1} relacionada aos estiramentos das ligações O-H e N-H; duas bandas, sendo uma em 2927 e outra em 2877 cm^{-1} referentes ao estiramento da ligação C-H de carbono sp^3 . Observam-se, também,

uma banda em 1652 cm^{-1} relacionada ao estiramento de carbonila de amida, uma em 1590 cm^{-1} característica de deformação fora do plano de $-\text{NH}_2$, e picos em 1420 e em 1320 cm^{-1} relacionadas ao anel glucosamídico.²⁶

Brugnerotto et al²⁷ apresentaram um trabalho sobre métodos para avaliação do grau de desacetilação de quitosana utilizando determinadas bandas de referência e características do espectro de IV. Foi demonstrado que para qualquer GD de quitosana, as bandas de 1420 e 1320 cm^{-1} são mais estáveis independente da técnica, estado ou estrutura do filme polimérico de quitosana.

Desta forma a partir da **Equação 1**, pôde-se determinar o grau de desacetilação da quitosana por estas banda, tendo as bandas de 1320 e 1420 cm^{-1} absorbâncias iguais a $0,5019$ e $0,5126$, respectivamente.

$$\%GD = 100 - \frac{(0,5019/0,5126) - 0,3822}{0,03133} = 80,95\%$$

Portanto, o grau de desacetilação da quitosana é, aproximadamente, 81%.

5.2 - Preparação e caracterização dos filmes

Como primeira parte do trabalho, foram preparados filmes com diferentes concentrações do polímero em solução para determinação da espessura e aspecto adequados para a imobilização da LPS-SD, como segue na **Tabela 1**.

Tabela 1. Aspecto macroscópico dos filmes de quitosana.

Filme^(a)	QTS (m/V)%	Vol. de Solução de QTS(mL)	Molde	Aspecto macroscópico
1	1%	50	Placa de Vidro	amarelado, fino, aderente ao vidro
2	1%	100	Placa PET	amarelado, fino
3	2%	50	Placa de Vidro	amarelado, firme, aderente ao vidro
4	2%	100	Placa PET	amarelado, semi-rígido, seco
5	2%	75	Placa PET	amarelado, firme, resistente
6	2%	50	Placa PET	amarelado, fino

(a) preparados em ácido acético: 0,2 mol/L

Os filmes constituídos de 1% de solução de quitosana apresentaram-se finos e não tão resistentes quanto os feitos com 2% de solução. Quanto aos moldes utilizados, aqueles feitos em molde de vidro perderam sua integridade devido à aderência com o vidro, pois ao ser retirado, as bordas ficaram mais alongadas do que a parte central do filme, o que impossibilitaria futuros ensaios mecânicos. Desta forma optou-se pela utilização do molde de PET. Este possibilitou a retirada completa do filme sem alguma deformação. Portanto, foi utilizada uma solução de 2% de quitosana com um volume de 75mL, visto que obtiveram as melhores características.

Nos filmes de quitosana contendo a LPS-SD não foi observado um aspecto macroscópico diferente dos filmes puros, ou seja, visualmente foram mantidas as características dos filmes.

5.3 Caracterização dos filmes por infravermelho(IV)

A espectroscopia de IV dos filmes de QTS e QTS/LSP-SD foi utilizada de forma a avaliar os grupos químicos da quitosana, bem como a relação deles com os presentes na enzima lipase, como é apresentado na **Figura 8**.

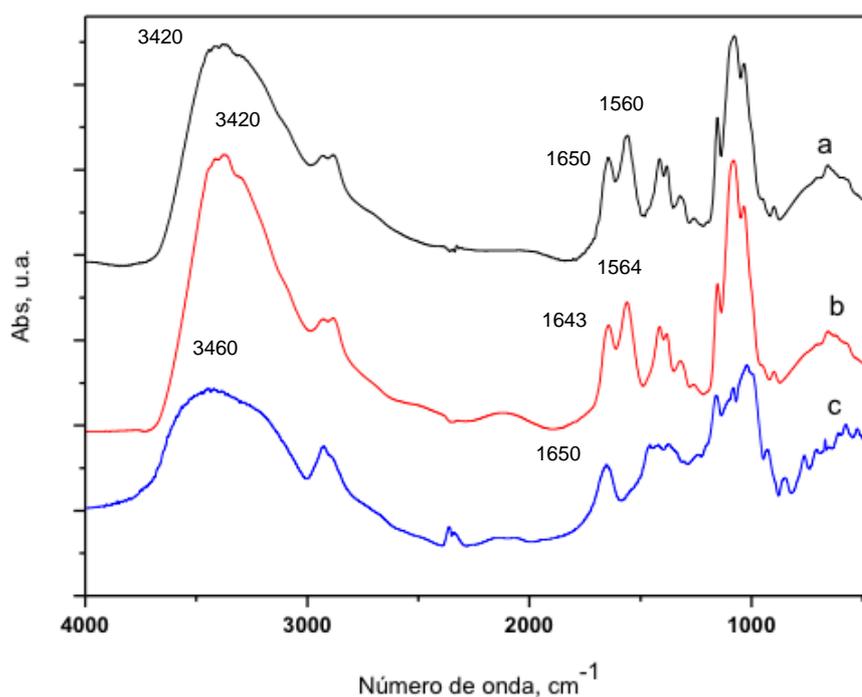


Figura 8. Espectro de infravermelho dos filmes de QTS (a), QTS/LPS-SD (b) e LPS(c).

O espectro infravermelho apresenta os principais sinais referentes aos grupos presentes em sua estrutura, em torno de 3420 cm⁻¹, atribuída à deformação axial do grupo O-H. Sinais características são a 1650 cm⁻¹, correspondente a amida I, 1560 cm⁻¹, relacionada ao grupamento -NH₃⁺, 1070 e 1030 cm⁻¹, devido ao estiramento C-O, 1314 cm⁻¹ devido ao grupo -CO-N-. O sinal intenso entre 800 cm⁻¹ e 1200 cm⁻¹ está relacionado com os anéis piranosídicos.²⁶

Para a enzima lipase na sua forma livre é apresentado um espectro típico de proteínas com banda de absorção associadas ao grupos carbonílico de amidas (CONH) em 1650 cm⁻¹ como também deformação O-H axial em 3460 cm⁻¹.

Para os filmes contendo a enzima lipase, observam-se que as principais bandas da quitosana estão presentes. Porém a banda por volta de 1560 cm^{-1} encontra-se deslocada em 1564 cm^{-1} , sugerindo que os grupamentos carboxilatos presentes na estrutura da lipase, interagem com os grupos NH^{3+} presentes na estrutura do filme.

5.4 - Determinação do ângulo de contato

A medida do ângulo de contato tem como princípio caracterizar a interação entre a superfície do filme de quitosana com presença ou não da enzima lipase e um determinado líquido como a água.

O objetivo desta análise é caracterizar a influência da LPS-SD no filme de forma a determinar a afinidade do mesmo com solventes polares e apolares, ou seja, descreve a sua hidrofobicidade.²⁸ De acordo com Assis et al²⁹, a molhabilidade é baseada pela presença de grupos polares e não-polares na superfície a ser analisada, estabelecendo duas formas de análises de acordo com o ângulo medido: caso o líquido molhe a superfície em ângulos $0^\circ < \theta < 90^\circ$ a superfície é considerada hidrofílica e hidrofóbica caso o ângulo medido seja entre $90^\circ < \theta < 180^\circ$.

Conforme descrito na metodologia, os ângulos de contato referentes à gota de água foram medidos como demonstra a **Figura 9** e os resultados obtidos são apresentados na **Tabela 2**.



Figura 9. ângulo de contato para água em Filmes de QTS(a) e de QTS/LPS(b).

Tabela 2. Ângulo de contato entre o filme e a gota de água.

Amostra	Média do ângulo (°)	Desvio padrão
QTS	78,46	0,34
QTS/LPS	81,51	2,76

De maneira geral, nota-se um pequeno aumento do ângulo de contato do filme contendo a enzima LPS-SD. Com este ensaio, observa-se que houve uma diminuição no caráter hidrofílico do filme de quitosana com a adição da enzima lipase, visto que a média do ângulo de contato do filme de QTS contendo a lipase é maior do que a do filme de QTS puro. Isso nos permite analisar que o processo de imobilização da enzima que possibilitou a sua fixação permitiu a maior exposição dos grupos hidrofóbicos que a constituem, transferindo esta característica ao filme de acordo com a sua dispersão.

Quanto a dispersão da enzima no filme, outra análise que pode ser feita a partir desses resultados é em relação ao desvio padrão, observa-se que o desvio para as análises do filme contendo a enzima foram altos demonstrando que a enzima não se encontra totalmente distribuída de forma homogênea nos filmes produzidos.

5.5 - Ensaio de tensão-deformação dos filmes de QTS e QTS/LPS

Propriedades mecânicas dos filmes de quitosana são influenciadas pela massa molar do polímero bem como das soluções ácidas utilizadas na solubilização do polímero para confecção do filme. As propriedades mecânicas que podem ser obtidas nas análises estão relacionadas com o comportamento do filme frente as tensões de deformação aplicadas, tais como medidas de tensão na ruptura,

elongação máxima e módulo de Young que caracteriza a parte elástica do filme, ou seja, proporciona uma medida da rigidez do material sólido.⁶

As curvas de tensão-deformação para os filmes de quitosana contendo a enzima ou não, apresentaram-se em três regiões de deformação: elástica, alongação e ruptura. A região elástica é onde a deformação varia linearmente com a tensão até o limite de resistência do material. A região de alongação ou plástica se caracteriza quando a força aplicada excede a tensão máxima suportada pelo filme e após deformação o filme não é capaz de retornar ao seu comprimento inicial. A região de ruptura representa o rompimento total do filme.⁶

As três regiões descritas podem ser encontradas nas Figuras do filme de QTS puro (**Figura 10**) e do filme de QTS/LPS-SD (**Figura11**) a seguir, e os dados representativos de cada região estão apresentados na **Tabela 3**.

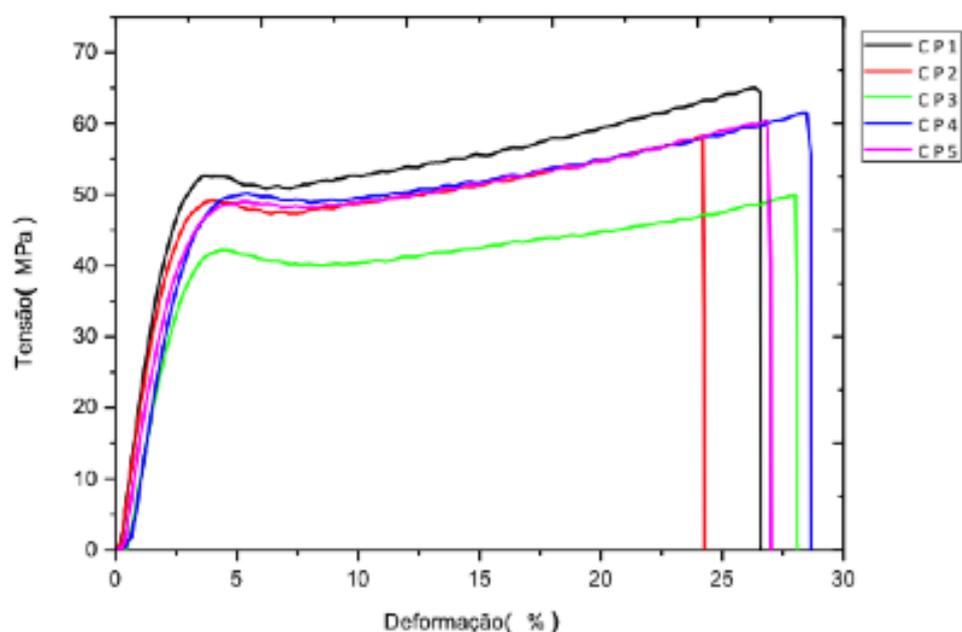


Figura 10. Ensaio mecânico do filme de QTS.

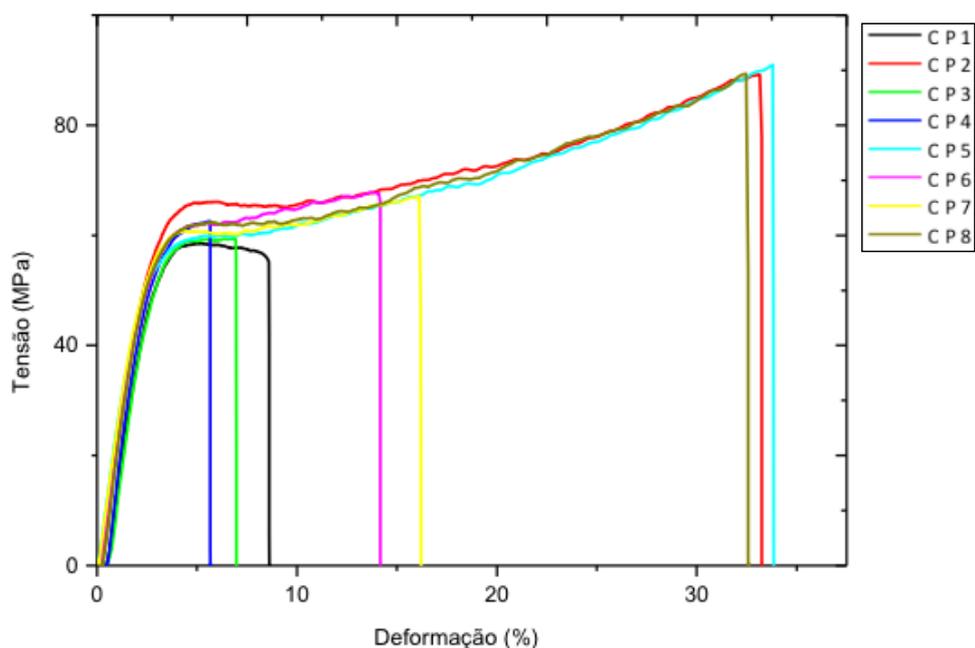


Figura 11. Ensaio mecânico do filme de QTS/LPS-SD.

Tabela 3. Dados referentes aos ensaios de tensão - deformação dos filmes.

Filme	Espessura (μm)	Tensão na ruptura (MPa)	Deformação/elongação (%)	Módulo de Young (MPa)
QTS	$51,60 \pm 8,15$	$58,80 \pm 5,54$	$26,27 \pm 1,50$	$2138,88 \pm 276,82$
QTS/LPS	$46,88 \pm 4,73$	$72,63 \pm 14,6$	$18,41 \pm 12,40$	$2939,00 \pm 184,50$

A partir da análise das curvas de tensão versus deformação, observa-se que os filmes preparados apresentam uma região elástica, em que a deformação varia linearmente com a tensão até o limite de resistência do material. Esta região caracterizada pelo módulo de Young, coeficiente angular da parte elástica linear dos

gráficos, demonstra que a lipase aumenta a capacidade de resistência à tensão do filme de quitosana, devido ao valor do módulo de Young encontrado no filme de QTS/LPS (2939,00) que é maior do que o encontrado no filme puro de QTS (2138,88).

Além da região elástica, são observados altos valores de tensão na ruptura e baixos valores de alongação que caracterizam um típico padrão de material frágil e rígido. A adição da enzima proporcionou uma certa mudança nas características mecânicas do filme, sendo observado a variação da elasticidade, alongação e ruptura, como é observado na **Tabela 3**.

A taxa de deformação do filme foi afetada pela enzima dado a maior elasticidade e menor alongação promovida a este, onde os valores de tensão na ruptura foram inferiores à 20 Mpa. Os dados posteriores encontrados no gráfico do filme de QTS/LPS-SD pode ser característico da região do filme de onde foram retirados os corpos de prova, pelo fato de não haver uma total homogeneização da solução de quitosana e da massa de lipase, o que pode ser demonstrado pelo alto valor de desvio padrão encontrado na região de alongação, plástica.

Os valores diferentes de alongação (porcentagem de deformação) referentes ao filme de QTS/LPS caracterizam, provavelmente, o local de onde foi retirado o corpo de prova, ou seja, corpos de prova que teriam sido retirados da parte central do filme possuem uma maior alongação e os demais retirados da borda do filme possuem uma menor deformação.

As análises feitas no ensaio de tensão-deformação podem ser relacionadas e são coerentes com os resultados obtidos na análise Dínamo-mecânica descrita a seguir.

5.6 - Ensaio dínamo-mecânico dos filmes de QTS e QTS/LPS

A análise dínamo-mecânica ou DMA (Dynamic Mechanical Analysis) é um método termoanalítico para a caracterização das propriedades mecânicas de um material quando este é submetido a forças dinâmicas (carga oscilante a uma determinada frequência) dentro de uma faixa de temperatura controlada. Esta análise

tem como objetivo estudar as propriedades elásticas e viscosas dos filmes, bem como a transição vítrea e transições secundárias.³⁰

Nas análises de DMA de ambos os materiais, foram obtidas as curvas de módulo de perda (**Figura 12**) e de estocagem (**Figura 13**), em MPa, vs temperatura (°C), além da curva de tan delta (**Figura 14**) vs temperatura (°C) de onde foram obtidas as transições vítreas e alfa-relaxação.

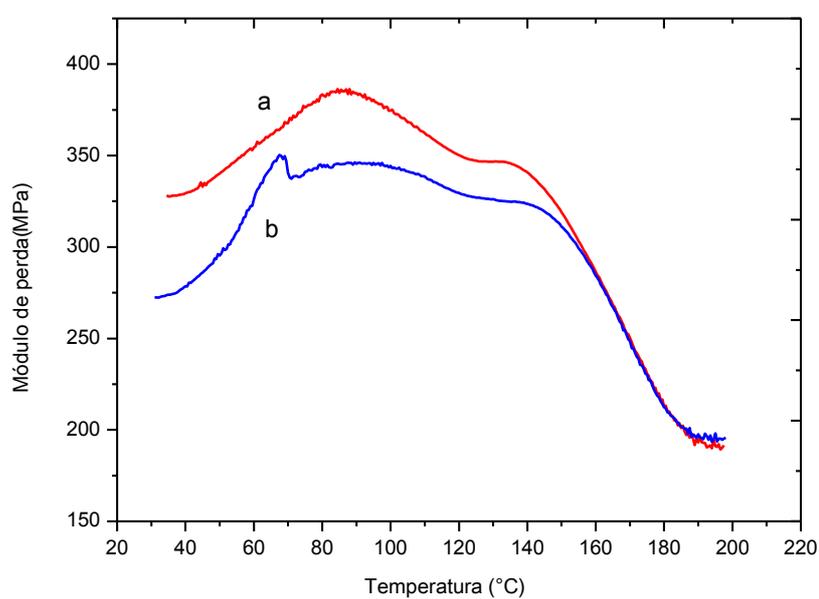


Figura 12. Módulo de perda para os filmes de QTS/LPS-SD (a) e QTS (b).

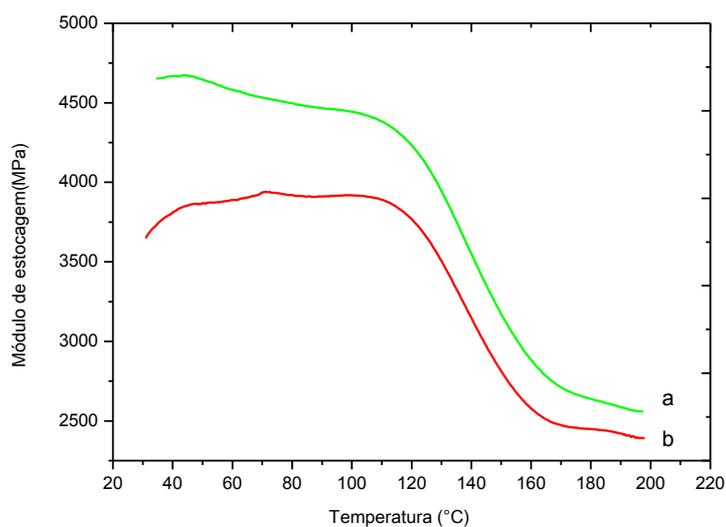


Figura 13. Módulo de estocagem para os filmes de QTS/LPS-SD (a) e QTS (b).

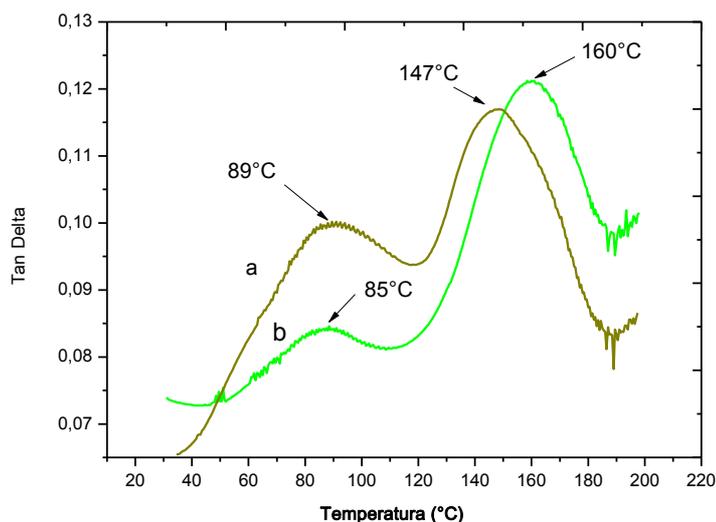


Figura 14. Tan Delta para os filmes de QTS/LPS-SD (a) e QTS (b).

Com a adição da enzima, houve o aumento do módulo de perda (**Figura 12**) e do módulo de estocagem (**Figura 13**) do filme de quitosana o que demonstra uma baixa elongação e maior elasticidade, como pode ser constatado nos gráficos de tensão-deformação apresentados anteriormente (**Figuras 10 e 11**). Essas conclusões são similares às encontradas em publicações por Matet et al.³¹ e Thakhiew et al.³² quanto a relação do módulo de perda com a parte elástica do filme e do módulo de estocagem com a parte viscosa do filme, elongação.

De acordo com o gráfico de tan delta, observaram-se dois picos para cada tipo de filme, onde um está representado por uma alfa-relaxação, em torno de 89° C para o filme QTS/LPS e 85° C para o filme de QTS, e o outro representa a Tg, transição vítrea, em torno de e 147 °C para o filme contendo a lipase e 159 °C para o filme de Quitosana puro (**Figura 14**). Na literatura, esta transição só é observada em filmes de quitosana carregados devido a presença de grupos NH_3^+ .³³

Como foi demonstrado, a adição da enzima promoveu uma certa maleabilidade ao filme, pelo fato de ter promovido a diminuição da Tg. Desta forma há uma maior mobilidade entre as cadeias poliméricas, dado a maior facilidade em migrar de um estado relativamente rígido para um estado borrachoso.

O pico referente à alfa-relaxação é reportado na literatura por Epure et al.³⁴ como sendo um comportamento comum de quantidades de água presentes no filme que conferem uma certa plasticidade ao mesmo. Esta transição também é reportada como sendo uma transição de desorção de umidade em filmes de quitosana, sendo relacionada em filmes de quitosana pela quantidade de grupos $\text{NH}_2/\text{NH}_3^+$ na estrutura dos filmes.³³

5.7 - Reação de esterificação com a LPS-SD imobilizada

Conforme demonstrado na parte metodológica, foram estudadas reações de esterificação entre o ácido láurico com *n*-propanol e *n*-butanol catalisada pela lipase de *Burkholderia cepacia* LPS-SD imobilizada em filme de quitosana por 24h, a temperatura de 35°C.

As porcentagens de conversão aos produtos foram determinadas através de ressonância magnética de Hidrogênio (^1H -RMN), a caracterização por Infravermelho (IV) e pureza por ccd.

Os dados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Conversão ao laurato de *n*-propila e ao laurato de *n*-butila.^(a)

Entrada	ÁLCOOL	Solução QTS no filme (%)	Massa de LPS (mg)	Conversão (%)^(b)
1	n-propanol	2,0	20 mg	91,0
2	n-butanol	2,0	20 mg	28,0
3	n-propanol	2,0	40 mg	<5,0
4	n-butanol	2,0	40 mg	nd
5^(c)	n-propanol	1,0	20 mg	<5,0
6^(c)	n-propanol	1,0	20 mg	<5,0

(a) ác. láurico (5 mmol), *n*-propanol/*n*-butanol (5 mmol), T=36°C, *n*-hexano (50mL), t= 24h;(b) determinada por ¹H-RMN; (c) reação feita em 48h; nd= não detectado

Como é observado, no teste preliminar da metodologia que seria empregada, foi obtido um resultado satisfatório na reação de **entrada 1** com uma conversão ao laurato de *n*-propila de 91%. A partir deste resultado, a reação foi feita com *n*-butanol como forma de teste para observar se a reação seria possível para substratos de cadeias maiores. Porém, como pode ser observado, para o laurato de *n*-butila foi obtido uma conversão de 28% (**entrada 2**).

Com os resultados das reações anteriores, foram feitas outras duas com uma maior quantidade de lipase (40 mg) para constatar se haveria aumento ou não na conversão em éster. Ao usar as condições de reação descritas, na **entrada 3**, o laurato de *n*-propila foi obtido com conversão <5%, e não foi detectado o produto na reação do ácido láurico com *n*-butanol (**entrada 4**).

Nas reações com menor quantidade de quitosana (1%), em que o filme se encontra menos espesso, e com maior tempo de reação, resultados menores que 5% também foram obtidos (**entradas 5 e 6**).

Durante o trabalho, foram feitas reações utilizando filmes de quitosana com as mesmas características e quantidade de lipase usadas nas condições da **Entrada 1**, e as conversões também foram <5%.

Desta forma, a atenção do estudo ficou voltada para a tentativa em reproduzir o resultado obtido nestas condições, onde o produto da reação foi caracterizado por IV e $^1\text{H-RMN}$, sendo condizente com a formação do laurato de *n*-propila. O produto apresenta-se como um líquido amarelado, com cheiro adocicado que são particularidades representativas de ésteres.

Observou-se que as baixas conversões obtidas poderiam estar relacionadas como a baixa quantidade de água necessária para atuação da enzima devido ao modo de secagem de produção dos filmes de QTS/LPS-SD, visto que a época que secagem eram diferentes, devido a influência da umidade relativa do ar que influencia na evaporação da água presente na solução de quitosana, bom como a utilização de chapas de aquecimento para confecção dos filmes, de forma a garantir uma rápida formação dos filmes para o preparo das reações.

Após obtenção do produto da reação nas condições da **Entrada 1**, não foi possível reaproveitar o suporte de quitosana com a lipase visto que o mesmo perdeu sua característica de filme, e ficou com um aspecto parecido ao gel, logo não foi possível fazer reuso em outras reações para determinar as demais taxas de conversão.

5.8 - Caracterização espectroscópica dos produtos da reação

O Laurato de *n*-propila obtido na reação de esterificação do ácido Láurico com o álcool propílico catalisada por enzima lipase imobilizada em filme de quitosana foi caracterizado por ressonância magnética de Hidrogênio ($^1\text{H-RMN}$) e por espectroscopia de infravermelho (IV).

A **Figura 17** mostra o espectro de $^1\text{H-RMN}$ do Laurato de *n*-propila obtido:

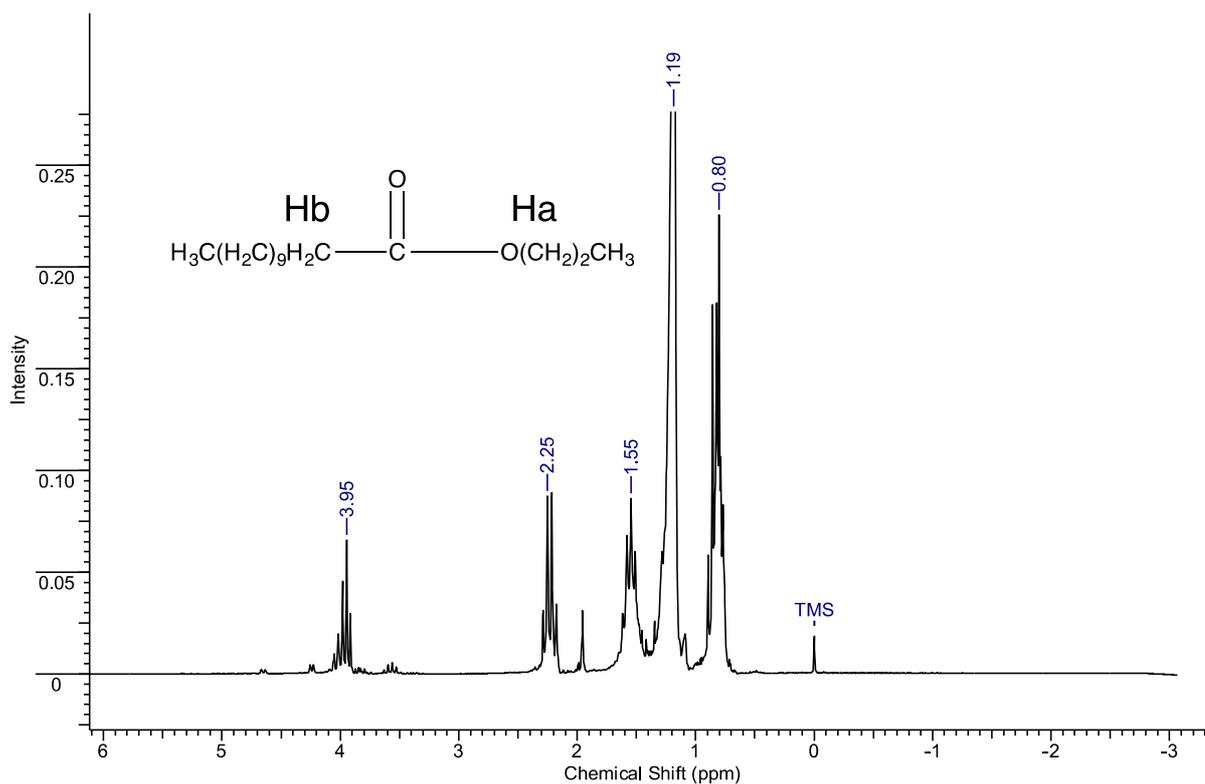


Figura 15. Caracterização do laurato de *n*-propila por $^1\text{H-RMN}$ [CDCl_3 , Varian $^1\text{H-RMN}$ 400 MHz].

Para sua caracterização, destacam-se os picos dos prótons metilênicos vizinhos ao oxigênio do grupo éster ($-\text{CH}_2\text{OCOR}$, Ha) e dos prótons vizinhos ao carbono da carbonila ($-\text{CH}_2\text{COOR}$, Hb), também do éster, sendo tripletos centrados em 2,25 ppm e 3,95 ppm, respectivamente.

A **Figura 16** mostra o espectro de infravermelho do ácido láurico e do laurato de *n*-propila apresentando bandas características de ambos compostos:

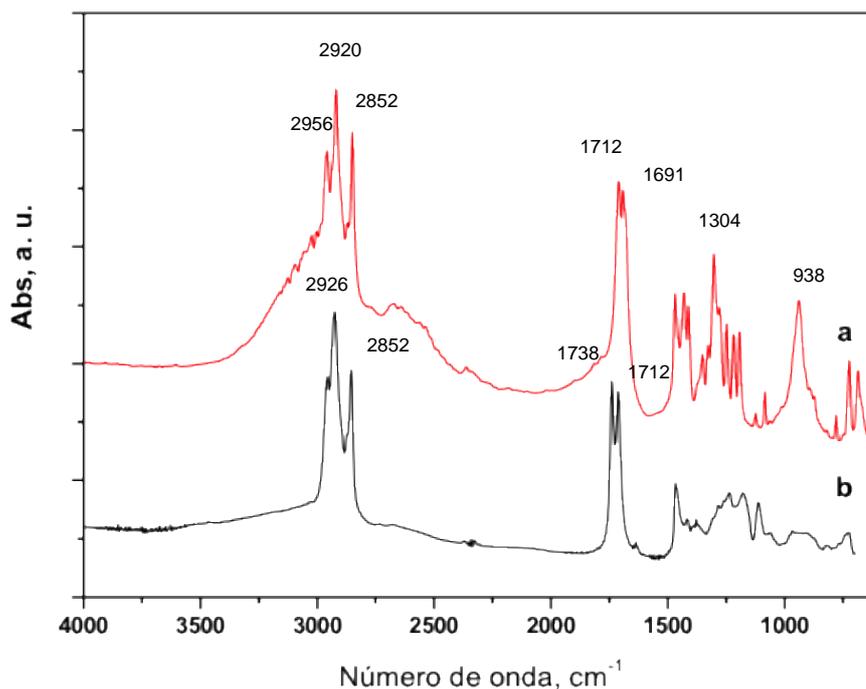


Figura 16. Espectro de IV do ácido láurico (a) e do Laurato de *n*-propila (b).

Analisando a **Figura 16**, observam-se bandas de infravermelho características do ácido Láurico e do laurato de *n*-propila. Nas regiões de 1738 cm^{-1} observa-se a banda de estiramento correspondente à carbonila do éster ($\text{C}=\text{O}$) e em 1712 cm^{-1} a banda de estiramento correspondente à carbonila do ácido láurico, a ligação O-H do ácido láurico com deformação angular fora do plano encontra-se em 938 cm^{-1} , o que não é encontrado no espectro do éster. Na faixa de 2852 cm^{-1} - 2956 cm^{-1} de ambos os espectros observam-se as bandas características de estiramento C-H alifático.²⁵

O Laurato de *n*-butila obtido na reação de esterificação do ácido Láurico com o álcool butílico foi caracterizado por ressonância magnética de Hidrogênio (^1H -RMN) e por espectroscopia de infravermelho (IV).

O espectro de ^1H -RMN do produto de reação da **entrada 2** com 28% de conversão é apresentado no **anexo 1**, onde, apesar das impurezas contidas, é possível determinar a taxa de conversão para o éster em questão. Apresentando também os picos característicos dos prótons dos carbonos metilênicos vizinhos à carbonila do éster em 4,08 ppm e dos prótons metilênicos do álcool vizinhos ao "OH" em 3,67 ppm.

No **anexo 2** observa-se o espectro de infravermelho do ácido láurico e dos produtos das reações feitas com o álcool butílico com 28% de conversão, **entrada 2** e da **entrada 4** onde não houve conversão.

São observados os espectros que representam o produto da reação de **entrada 2**, onde demonstra uma certa conversão ao produto dado a inexistência da banda de OH com estiramento fora do plano, em torno de 942 cm^{-1} . O espectro da amostra da reação de **entrada 4** confirma o que pôde ser determinado pelo espectro de $^1\text{H-RMN}$ em que apresentou picos característicos do reagente de partida, ácido láurico (**anexo3**), bem como bandas com os mesmos comprimentos de onda, no caso do IV.²⁵

6. CONCLUSÕES

- As análises mecânicas demonstraram que a enzima lipase promove a alteração das propriedades do filme de quitosana deixando-o mais maleável e mais resistente à tensão.

- A análise espectroscópica dos filmes demonstraram que a enzima é capaz de ser imobilizada no filme de quitosana ao apresentar o deslocamento da banda característica dos grupos carboxílicos da enzima interagidos com NH_3^+ presentes na estrutura do filme.

- Os resultados obtidos nas análises dos filmes demonstraram que a enzima se encontra imobilizada, mas não de forma homogênea. Apesar de estar imobilizada, esta não foi capaz de atuar na maioria das reações de esterificação estudadas.

- As baixas conversões obtidas podem estar relacionadas com o baixo pH da solução de quitosana utilizada na confecção dos filmes, visto que as enzimas possuem um pH ótimo de atuação; e também a baixa quantidade de água presente no filme após a secagem, pois a enzima necessita de uma quantidade mínima de água para a manutenção da estrutura quaternária, integridade estrutural do sítio e capacidade de atuação.

- O estudo demonstrou a possibilidade de imobilização da LPS-SD em filmes de quitosana, mas para que haja um melhor proveito novos testes seriam necessários: como avaliar outros tipos de imobilização, modo e tempo de secagem dos filmes de forma a manter a quantidade mínima de água necessária para a enzima, ajustes de pH das soluções de quitosana e testes com outros tipos de lipases.

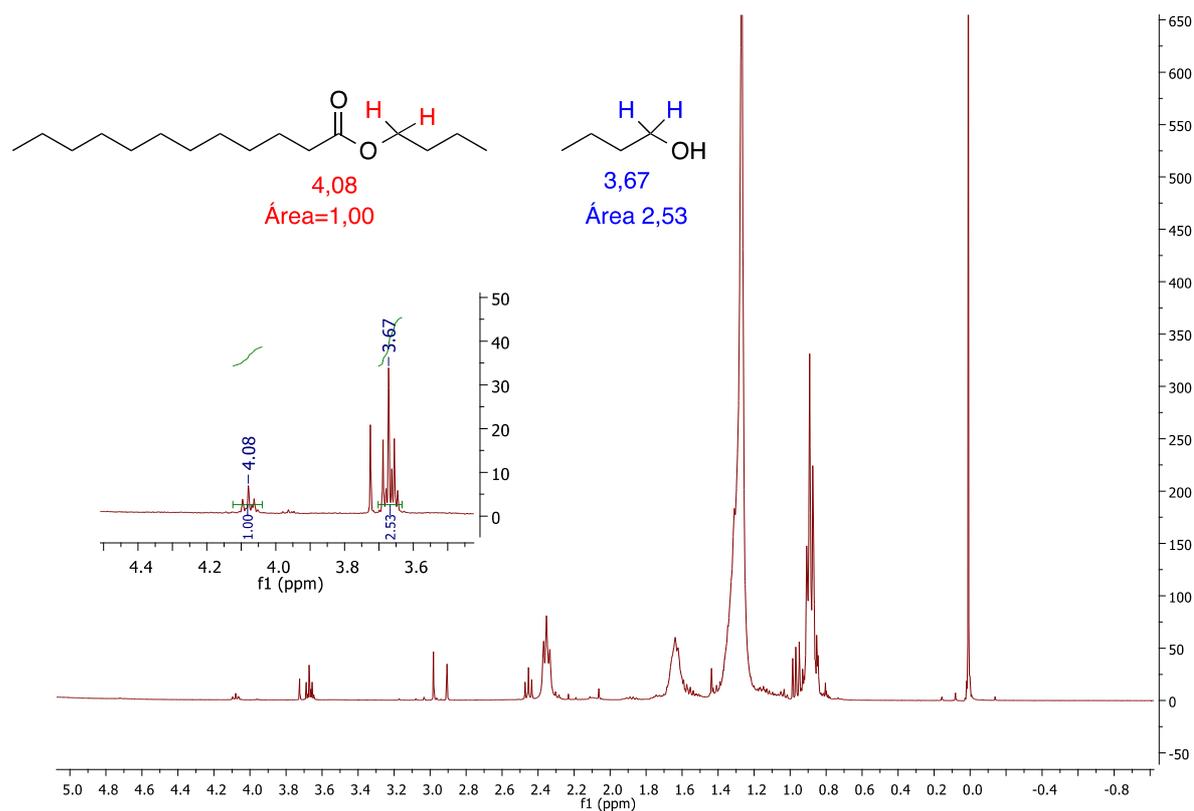
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Viera, M.G.A.; da Silva, M.A.; dos Santos, L.O.; Beppu, M.M.; *Eur. Polym.*, 47, 254-263, **2011**.
2. Peter, M.; *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.*, A32, 629–640, **1995**.
3. Krajewska, B.; *Enzyme Microb. Technol.*, 35,126–139, **2004**.
4. Anitha, A.; Sowmya, S.; Sudheesh, K.P.T.; Deepthi, S.; Chennazhi, K.P.; Ehrlich H.; Tsurkan M.; Jayakumar R.; *Prog. Polym. Sci.*, 39, 1644-1667, **2014**.
5. Batista, K. A.; Lopes, F. M.; Yamashita, F.; Fernandes, K. F.; *Mat. Sci. and Eng. C.*, 33, 1696-1701, **2013**
6. Parize, A. L. *Desenvolvimento de sistemas microparticulados e de filmes a base de quitosana e corante natural cúrcuma*. 2009. 176 f. Tese (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.
7. Orrego, C.E.; Salgado, N.; Valencia, J.S.; Giraldo, G.I.; Giraldo, O.H.; Cardona, C.A.; *Carbohydr. Polym.*, 79, 9-16, **2010**.
8. Kourkoutasa, Y.; Bekatoroua, A.; Banatb, I. M.; Marchantb, R.; Koutinasa, A.A.; *Food Microb.*, 21, 377-397, **2004**.
9. Mateo, C.; Palomo, J.M.; Fernandez-Lorente, G.; Guisan, J.M.; Fernandez-Lafuente, R.; *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 1451-1463, **2007**.
10. Brady, D.; Jordaan, J.; *Biotechnol. Lett.*, 31, 1639-1640, **2009**.
11. Nelson, D.L.; Cox M.M.; *Princípios de Bioquímica de Lehninger*, vol. 2, 3ª Ed., W. H. Freeman and Company, **2000**.
12. Romdhane, I.B.B.; Romdhane, Z.B., Gargouri, A.,Belghith, H., *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, , 68, 230-239, **2011**.
13. Kapoor, M.; Gupta, M.N.; *Process Biochem.*, 47, 555-569, **2012**.

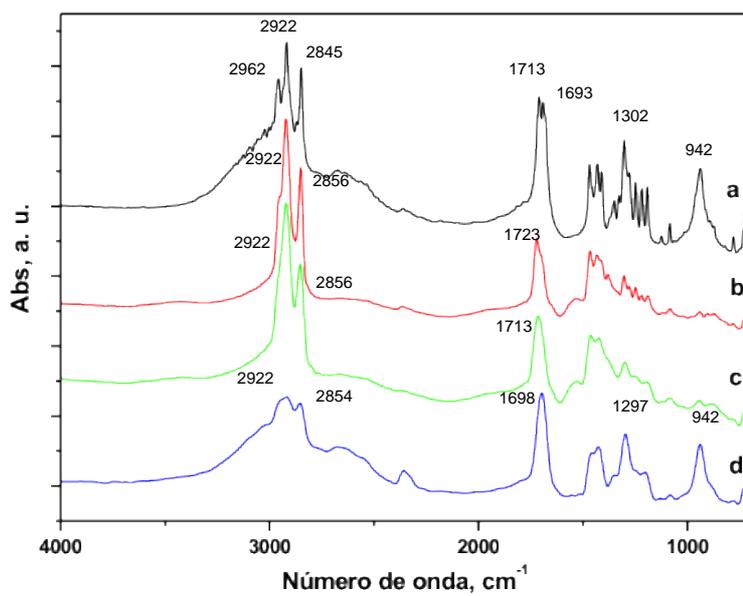
14. Shamel, M.M.; Ramachandran, K.B.; Hasan, M.; Al-Zuhair, S.; *Biochem. Eng. J.*, 34, 228–235. **2007**.
15. Huanf, F.C.; Hu, Y.H.; Huang, C.W.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 74, 977–981, **1997**.
16. Tan, T.; Kaili, N.; Wang, F.; *J. Appl. Biochem. Biotechnol.*, 128, 109–116, **2006**.
17. Gupta, S.; Bhattacharya, A.; Murthy, C.N.; *Biocatal. Agro. Biotechnol.*, 2, 171-190, **2013**.
18. Yu, W.H.; Tong, D.S; Fang, M.; Shao, P.; Zhou C.H.; *J. Mol. Catal. B: Enzym*, 111, 43-50, **2015**.
19. Torres, C.F.; Torrelo, G.; Vazquez. L.; Señorans, J.; Reglero, G.; *J. Biosci. Bioeng.*, 106, 559-562, **2008**.
20. Khan, N.R.; Rathod, V.K.; *Process Biochem.*, 50, 1793-1806, **2015**.
21. McMurry, j.; Química Nova; 4ª Ed.; v.2; p.188; **1997**.
22. Gandhi, N.N.; *J. Am. Oil Chem. Soc.*; 74(6), 621-634, **1997**
23. Oliveira, P.C; Alves, G.M.; Castro, H.F.; *Quím. Nova*, 23(5), 632-636, **2000**.
24. Paula, A. V.; Barboza, J.C. de S.; Castro, H.F.; *Quím. Nova*, 23(5), 632-636, **2000**.
25. ASTM D882-00, AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS – ASTM. Standard test methods for tensile properties of thin plastic sheeting. Philadelphia: ASTM, **2001**.
26. Silverstein, R. M., Webster, F. X.; **Identificação Espectrométrica de Compostos orgânicos**. 6ª Ed. LTC, Rio de janeiro, **2000**.
27. Brugnerotto, J.; Lizardi, j.; Goycoolea, F.M.; Arguelles-Monal, W.; Desbrières, J.; Rinaudo, M.; *Polymer*, 42, 3569,**2001**
28. Shaw, D. J., Introdução à Química de Colóides e Superfícies; Editora Edgard Blucher/Edusp, 1a Ed., **1975**, S.P.;
29. Assis, O.B.G.; *Quím. Nova*, 33(3), 603-606, **2010**.

30. De souza, J.P.B. *Análise térmica de polímero DGEBA(diglicidil éter de bisfenol A) e sua relação na resistência de juntas coladas*. 2012. 89 f. Dissertação (mestrado em engenharia mecânica)- Departamento de engenharia Química, Universidade Federal Fluminense, Niterói, **2012**.
31. Matet, M.; Heuzey, M.C.; Pollet, E.; Ajji, A.; Averous, L.; *Carbohydr. Polym.* 95, 241-251, **2013**.
32. Thakhiew, W.; Devahastin, S.; Soponronnarit, S.; *J. Food Eng.* 119, 140-149, **2013**.
33. Gartner, C.; López, B.L.; Sierra, L.; Graf, R.; Spiess, H.W.; Gaborieau, M.; *Biomacromol.* 12, 1380-1386, **2011**.
34. Epure, V.; Griffon M.; Pollet, E.; Avérous, L.; *Carbohydr. Polym.*, 83, 947-952, **2011**.

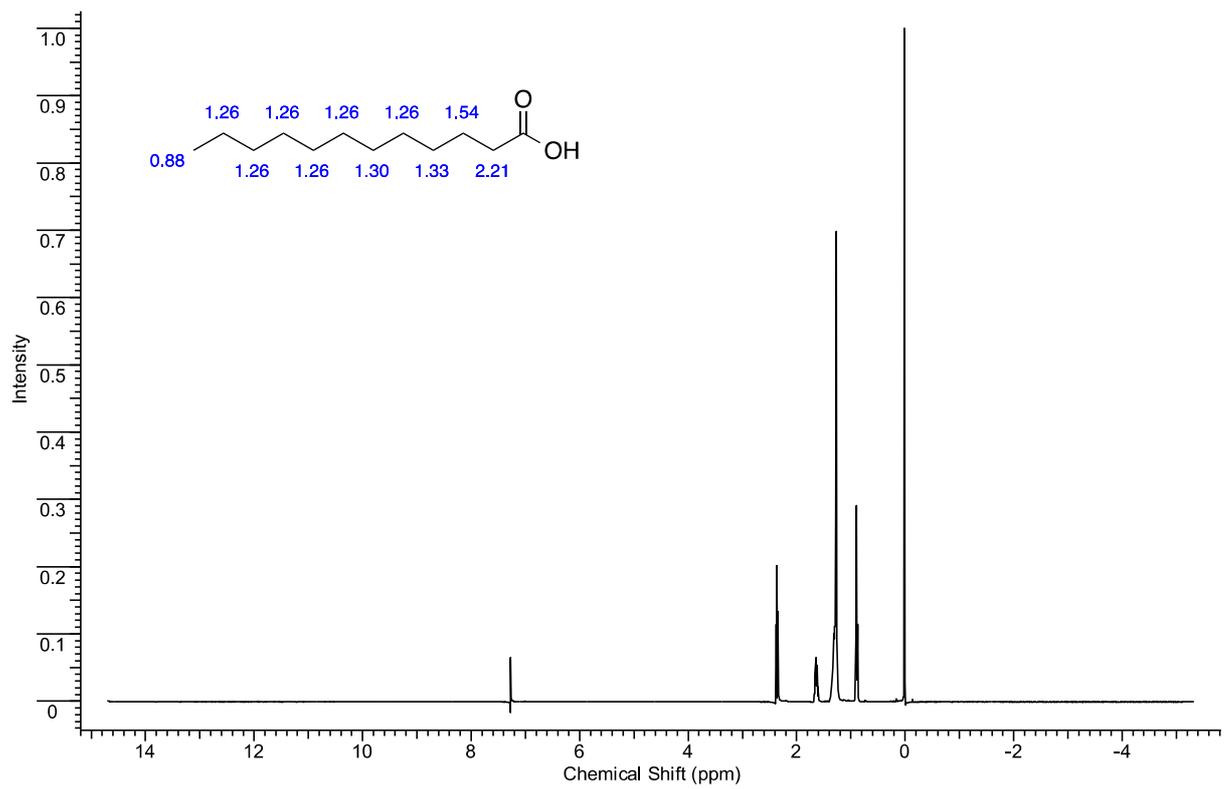
8. ANEXOS



Anexo 1 - Espectro de ¹H-RMN do laurato de n-butila. Conversão de 28% **Entrada 2**. [CDCl₃, Varian ¹H-RMN 400MHZ]



Anexo 2 - Espectro de IV do ácido láurico (a) e dos produtos das reações: entradas 2 (b,c) e 4 (d).



Anexo 3 - Espectro de $^1\text{H-RMN}$ do ácido Láurico [CDCl_3 , Varian $^1\text{H-RMN}$ 400MHz]