

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

**POLIMERIZAÇÃO DE (ϵ -CAPROLACTONA) UTILIZANDO NOVOZYM 435 EM
DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

EMANUEL BIANCHIN

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação *Stricto-Sensu*, em Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, como requisito parcial à obtenção do Grau de Mestre em Engenharia de Alimentos, Área de Concentração: Engenharia de Alimentos, da Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Campus de Erechim.

ERECHIM, RS – BRASIL
JULHO DE 2011

URI - CAMPUS ERECHIM
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

EMANUEL BIANCHIN

**POLIMERIZAÇÃO DE (ϵ -CAPROLACTONA) UTILIZANDO NOVOZYM 435 EM
DÍÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO**

ERECHIM, RS - BRASIL

FEVEREIRO DE 2009

Dedico este trabalho:

À minha namorada, Deise Guero, pela paciência, companheirismo e por estar sempre ao meu lado me encorajando nos momentos mais difíceis nesta etapa de minha vida;

Aos meus pais, Severino Bianchin e Derci Sozo Bianchin, pela educação, amor, carinho, apoio e ensinamento.

AGRADECIMENTOS

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

Aos meus pais Severino e Derci, pelo carinho, incentivo e ajuda.

Aos Professores José Vladimir de Oliveira e Débora de Oliveira, pela orientação, confiança e ensinamentos transmitidos.

À Sibeles Rosso, por ter sido como um de meus orientadores, pela paciência, e ajuda no desenvolvimento deste trabalho, que com certeza fez todo o diferencial. Obrigado por tudo.

Aos professores da URI – Campus de Erechim, que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Ao pessoal do Laboratório de Termodinâmica Aplicada da URI pela assistência.

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

Agradeço ao meu amigo Guilherme Balsan, pelo incentivo no decorrer do curso.

Agradeço à minha namorada, Deise Guero, minha companheira, pela paciência, compreensão e por acreditar que tudo daria certo.

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

PRODUÇÃO ENZIMÁTICA DE POLI(ϵ -CAPROLACTONA) EM DIÓXIDO DE CARBONO SUPERCRÍTICO

Emanuel Bianchin

Orientadores: José Vladimir de Oliveira

Débora de Oliveira

A utilização de materiais poliméricos derivados do petróleo vem se constituindo em um sério problema a ser resolvido, devido ao longo período de degradação, acarretando assim em impacto ambiental. Neste sentido, a utilização e a produção de materiais biodegradáveis têm sido notícia em diversos setores da sociedade. No presente estudo, foi avaliada a produção de poli(ϵ -caprolactona), polímero reconhecidamente biodegradável, em dióxido de carbono supercrítico catalisada por uma lipase comercial Novozym 435. Policaprolactona (PCL) é um dos mais atrativos poliésteres alifáticos para aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e compatibilidade com uma ampla faixa de polímeros. A síntese de policaprolactona em dióxido de carbono supercrítico catalisada por lipase foi realizada em sistema batelada, a fim de avaliar: (1) o efeito do teor mássico de enzima em relação ao monômero, (2) o efeito da pressão na reação e (3) a razão mássica solvente/monômero sobre o rendimento da reação. A análise estatística dos resultados mostrou que tanto a massa de enzima quanto o efeito cruzado entre concentração de enzima e a relação solvente:monômero foram significativos (95% de confiança) no rendimento. De acordo com o planejamento experimental, com duas horas de reação, os maiores rendimentos foram obtidos para as reações com 15% de enzima, que variaram de 63 a 76%. No entanto, rendimentos similares aos obtidos utilizando-se 15% de enzima foram alcançados em cerca de 8 e 12 horas de reação para a cinética com 5% de enzima, obtendo-se valores de 65 e 75%. A atividade enzimática medida para as diversas condições de operação e ao longo do tempo indicou a possibilidade de reuso da enzima.

Abstract of Dissertation presented to Food Engineering Program as a partial fulfillment of the requirements for the Master in Food Engineering

LIPASE-CATALYZED PRODUCTION OF POLY(ϵ -CAPROLACTONE) IN SUPERCRITICAL CARBON DIOXIDE

Emanuel Bianchin

Advisors: José Vladimir de Oliveira

Débora de Oliveira

There has been a growing interest in the development of biopolymers toward reducing environmental problems. In this work, the production of poly(ϵ -caprolactone) was investigated in supercritical carbon dioxide medium using a commercial lipase, Novozym 435. For this purpose, the experiments were conducted in batch mode assessing the effects of enzyme concentration, system pressure and solvent to substrate (caprolactone monomer) molar ratio on the reaction yield. The statistical analysis of the results revealed that the enzyme content and the cross effect of enzyme concentration and solvent to substrate ratio were significant at 95% confidence level. According to the experimental design, short reaction times (two hours) led to the highest yields for 15 wt% enzyme, from 63% to 76%. Nevertheless, similar reaction yields were also verified using 5 wt% enzyme at longer times, 8 and 12 hours, affording 65% e 75%, respectively. Enzyme activity measured for various reaction conditions maintained almost invariant, hence indicating possible catalyst reuse.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Representação esquemática de estruturas moleculares das cadeias poliméricas. (a) Lineares, (b) Ramificadas, (c) Com ligações cruzadas e (d) Em rede. Os círculos representam as unidades monoméricas que se repetem (CALLISTER, 2002). 17
- Figura 2 - Representação esquemática de um homopolímero e de copolímeros (RAMOS, 2007). 18
- Figura 3 - Representação das reações de polimerização: (a) Formação de poliéster por meio da policondensação entre um diol e um diácido, com eliminação de água. Se $R = (CH_2)_2$ e $R' = \text{fenila}$, o poliéster formado é o poli(tereftalato de etileno). (b) Polimerização do estireno exemplificando a formação de um polímero de adição, em que n é o grau de polimerização do polímero resultante (AKCELRUD, 2007). 18
- Figura 4 - (a) Polimerização em cadeia para a formação de polietileno. Esse processo envolve três estágios distintos (iniciação, propagação e terminação), em que na iniciação uma espécie catalisadora reage com o monômero, formando um complexo ativo. Na propagação ocorre o crescimento linear da molécula à medida que unidades do monômero se fixam umas às outras em sucessão. A etapa de terminação se encerra quando as extremidades ativas de duas cadeias que se propagam reagem entre si, formando uma molécula não-reativa. (b) Reação em etapas representada pela formação de um polioli poliéster. O polímero é formado mediante reações intermoleculares entre o etilenoglicol e o ácido adípico, com eliminação de água (CALLISTER, 2002). 19
- Figura 5 - Degradação de um polímero através de diferentes processos. 23
- Figura 6 - Fotografia em tamanho natural de flocos de poli(ϵ -caprolactona) de aproximadamente 3 mm de diâmetro e massa molar entre 70000 e 90000 g/mol (SANTOS, 2011). 25
- Figura 7 - (a) Estrutura química da ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$. (b) Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com o anel aberto (SIGMA-ALDRICH, 2010). 26
- Figura 8 - Diagrama p-t para um fluido puro (cooper, 2000). 27
- Figura 9 - Estrutura tridimensional da CAL-B (SANTOS, 2011) 30
- Figura 10 - Mecanismo de polimerização de lactonas 31

Figura 11 - Amostra da enzima utilizada nas reações, lipase comercial imobilizada Candida antarctica, a Novozym 435, fornecida pela Novozymes S/A.	34
Figura 12 - Sistema composto de um banho termostático e reatores utilizados para a determinação da atividade enzimática.	36
Figura 13 - Diagrama de Pareto para o rendimento da polimerização com nível de significância de 95%.	39
Figura 14 - Cinética de produção de poli(ϵ -caprolactona) e atividade enzimática residual a 120 bar, 65 °C, razão mássica CO ₂ : ϵ -caprolactona de 1:2 e 5 % (m/m) de enzima.	40
Figura 15 - Resultados da cinética de conversão para a polimerização da ϵ -caprolactona a 120 bar, 65 °C, fração mássica de CO ₂ : ϵ -caprolactona 2:1 e 3%, 5% e 15% de enzima.	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características da lactona estudada.....	33
Tabela 2 - Resultados do planejamento para a produção de poli(ϵ -caprolactona) em CO ₂ supercrítico catalisada por lipase para duas horas de reação e temperatura de 65°C.....	37

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivo geral	13
2.2 Objetivos específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1 Polímeros	14
3.1.1 Classificação dos polímeros.....	15
3.1.2 Estrutura dos polímeros	16
3.1.3. Tipos de polímeros	17
3.1.4 Propriedades dos polímeros	19
3.1.5 Biodegradação e biocompatibilidade.....	20
3.1.6 Fatores de degradação dos polímeros.....	21
3.1.7 Processo de degradação de biopolímeros	22
3.1.8 Mercado de biopolímeros.....	23
3.2 Poli(ϵ-caprolactona)	24
3.3 Fluidos supercríticos	26
3.4. Lipases como catalisadores	29
3.5 Polimerização por abertura do anel “Ring-Opening Polimerization” (ROP)	30
3.6 Considerações a respeito do estado da arte	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1 Materiais	33
4.2 Procedimento experimental	34
4.3 Determinação da atividade enzimática	35
4.4 Planejamento experimental	36
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÕES	43
6.1 Sugestões	43
7 REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

Ao longo da década de 90, o processo de polimerização mediado por enzimas emergiu como um método novo e importante para a produção de polímeros. Como os catalisadores tradicionais normalmente contenham espécies de metais tóxicos e prejudiciais ao ambiente, a catálise enzimática é muitas vezes vista como uma alternativa favorável (KRISTOFER et al., 2006).

Abordagens biocatalíticas em ciência de polímeros são esperadas para incrementar ainda mais a diversidade de materiais poliméricos. Grande progresso tem sido alcançado nos últimos anos na aplicação de catálise enzimática em ciência dos polímeros. A aplicação de enzimas em síntese e transformação de polímeros apresenta-se como técnica bastante atrativa (GEUS et al., 2005).

Em particular, a produção de polímeros biodegradáveis de alta pureza é importante, considerando seu potencial de aplicação nas diversas áreas de medicina e de alimentos (GREGOROWICZ, 2008), considerando que os polímeros sintéticos levam em média 150 anos para se degradarem, a consequência direta é a poluição ambiental. Assim, vários países no mundo já reconheceram a necessidade de desenvolver restrições ambientais baseadas numa verdadeira política de resíduos não-degradáveis voltada para o princípio dos 3R: reduzir a periculosidade desses resíduos, reutilizar quando possível, reciclar para produção de novos produtos (SEBIO, 2003).

O reverso dessa transformação é o enorme problema ambiental que o acúmulo desses materiais começa a gerar. Apesar de garantirem uma proteção desejada para diversos tipos de aplicações satisfazendo a necessidade de custo, conveniência, formatos, marketing, proteção física, química e ótica, os materiais plásticos utilizados atualmente não são, em sua maioria, biodegradáveis e são responsáveis por grande parte de resíduos que se acumulam na natureza (GONTARD & GUILBERT, 1994).

No Brasil, são geradas diariamente cerca de 228.413 toneladas de resíduo. Dentre os materiais provenientes de coleta seletiva, 20% são plásticos e o destino final desses materiais é muitas vezes incerto. Quando são descartados em meio aquático, fica difícil removê-los, restando-lhes a possibilidade de ali permanecer, podendo ou não degradar (FARIA 2009).

Visando atenuar esses problemas, inúmeros estudos têm sido realizados no sentido de apresentar materiais plásticos alternativos. Surgiu, então, o conceito de plástico biodegradável associado ao uso de matérias-primas renováveis. Os biopolímeros, como são chamadas essas matérias-primas, são macromoléculas sintetizadas seja por processos

biológicos, seja por via química a partir de monômeros naturais ou idênticos aos naturais (GUILBERT, 1992).

Os catalisadores enzimáticos frequentemente apresentam vantagens consideráveis por apresentarem alta enantiosseletividade-1 e quimiosseletividade. Mais importante ainda, esses catalisadores podem operar em condições mais brandas do que os catalisadores metálicos e são considerados alternativas biocompatíveis (KRISTOFER et al., 2006).

A utilização de recursos naturais renováveis como alternativa para produtos derivados de combustíveis fósseis vem ganhando preferência, principalmente devido à sua disponibilidade inesgotável e às condições ambientais (van DAM et al., 2005; JUAIS, 2009). A preocupação ambiental levou a comunidade científica a buscar caminhos visando diminuir o uso de compostos orgânicos voláteis (STASSIN et al., 2000). Nesse caso, a busca pelo uso de catalisadores enzimáticos é fator determinante. Isso se deve a sua capacidade de operar em condições amenas, reciclabilidade e biocompatibilidade, já que a produção de substâncias de alta pureza exige a utilização de reagentes não-tóxicos e economicamente viáveis (HANS, 2006).

Os processos envolvendo fluidos supercríticos têm atraído especial atenção nas últimas décadas. Suas aplicações têm amplo alcance como em processos de extração, separação, fracionamento, reação e processamento de fármacos e polímeros (KALOGIANNIS e PANAYITOU, 2006). Particularmente, a tecnologia que emprega fluidos supercríticos e pressurizados tem recebido recentemente grande atenção no campo da formação de partículas de polímeros biodegradáveis, que podem ser usados como sistemas de liberação controlada de drogas e agentes bioativos (YUE et al., 2004).

As características atrativas de fluidos em condições supercríticas demonstram que estes podem ser facilmente separados dos produtos da reação pela diminuição da pressão do sistema. Além disso, fluidos supercríticos têm propriedades de solventes que são ajustáveis entre os limites dos estados líquido e gasoso. Os fluidos na proximidade do ponto crítico apresentam alta difusividade e baixa viscosidade, característica dos gases, e densidade semelhante à dos líquidos (LOEKER et al., 2004).

Muita atenção tem sido dedicada à catálise enzimática empregando o dióxido de carbono supercrítico (CO₂ supercrítico), sobretudo pelo baixo custo, por ser atóxico, não inflamável, e pelo fato de que seus parâmetros críticos podem ser facilmente alcançados (LOEKER et al., 2004).

Uma das enzimas mais comumente empregadas na reação de polimerização de caprolactona é a lipase de *Candida antarctica* fração B (CALB). A forma da enzima imobilizada (Novozym 435) tem se mostrado extremamente eficaz para catalisar a polimerização de abertura de anel (Kristofer et al., 2006), uma vez que a polimerização é

simplesmente uma série de reações de policondensação completamente aleatórias que produz polímeros com índice de polidispersão típico de reações de poli-condensação.

A estabilidade de lipases em meio orgânico e sua capacidade para promover a transesterificação e reações de condensação em uma ampla gama de substratos de baixa e alta massa molar tem sido demonstrada. A aplicação de enzimas como catalisadores em um ambiente não-natural era até agora predominantemente de domínio da química orgânica (GEUS et al., 2005).

A policaprolactona (PCL) é um poliéster alifático para aplicações biomédicas devido a sua biocompatibilidade, biodegradabilidade e compatibilidade com uma ampla faixa de polímeros (STASSIN et al., 2001).

Kristofer et al. (2006) mostraram que o produto resultante da polimerização da caprolactona ocorre em CO₂ supercrítico com massa molar e índice de polidispersão comparáveis aos que se formam em solventes orgânicos líquidos convencionais.

O uso de Dióxido de Carbono Supercrítico (CO₂) apresenta uma alternativa na produção de biopolímeros. A tentativa de avaliar seus efeitos na polimerização surge como desafio. É dentro desse contexto que este estudo objetiva investigar a produção de poli(ϵ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico(CO₂), catalisada pela lipase comercial Novozym-435. O parâmetro empregado para avaliação da produção foi o rendimento da reação em termos de polímero produzido. Além disto, foi determinada a atividade da enzima após a reação com o intuito de verificar a possibilidade de seu reuso. Deseja-se, assim, colaborar cientificamente com este campo do conhecimento, onde se verifica flagrante carência de estudos sistemáticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O trabalho proposto tem como objetivo geral a produção de poli(ϵ -caprolactona), em meio contendo dióxido de carbono supercrítico utilizando uma lipase comercial como catalisador.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar o efeito das variáveis que influenciam a reação de polimerização como: teor mássico de enzima em relação ao monômero, pressão e razão mássica solvente/substrato;
- Determinar a atividade enzimática da enzima comercial utilizada (Novozym 435) com a finalidade de verificar o impacto das condições reacionais sobre a enzima;
- Determinar experimentalmente a cinética da reação de polimerização;
- Selecionar condições para a cinética de polimerização.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Polímeros

Polímeros são definidos como moléculas grandes, contendo um número de átomos encadeados superior a uma centena. Suas propriedades se chamam macromoléculas de elevadas massas molares, podendo ou não ter unidades químicas repetidas. Quando a macromolécula é composta por unidades relativamente simples, repetidas várias vezes, ela é denominada polímero (do grego, muitas partes). Portanto, os polímeros são macromoléculas caracterizadas por seu tamanho, estrutura química e interações intra e intermoleculares. Os polímeros que ocorrem normalmente na natureza são chamados de biopolímeros, enquanto que aqueles obtidos por síntese a partir do petróleo são chamados polímeros sintéticos; porém o mesmo princípio básico de tecnologia aplica-se para ambos.

De acordo com o comportamento mecânico, os materiais poliméricos podem ser divididos em três grandes grupos (BILLMEYER, 1984):

- As borrachas ou elastômeros são materiais que apresentam elasticidade em longa faixa, à temperatura ambiente;

- Os plásticos são materiais macromoleculares orgânicos usualmente tendo por base resinas sintéticas ou polímeros naturais modificados, que embora sólidos no estado final, em algum estágio de seu processamento podem tornar-se fluidos e moldáveis por ação isolada ou conjunta de calor e pressão;

- As fibras englobam macromoléculas lineares orientáveis longitudinalmente, com estreita faixa de extensibilidade, parcialmente reversíveis, termoestáveis, infusíveis em alguns casos e sem alteração substancial das propriedades mecânicas.

Através das características tecnológicas de fusão e/ou de solubilidade, os polímeros podem ser agrupados em:

- Termoplásticos que fundem por aquecimento e solidificam por resfriamento em um processo reversível e podem sofrer processo de extrusão, laminação e injeção caracterizando os polímeros lineares ou ramificados. Eles estão sujeitos a um grau de degradação química que limita o número de reciclagens.

- Termorrígidos ou termofixos que fundem por aquecimento, porém sofrem reação química que causa a formação de ligações cruzadas intermoleculares, resultando numa estrutura reticulada, infusível e insolúvel. Não permitem reprocessamento, pois seu formato não pode ser modificado.

3.1.1 Classificação dos polímeros

a) Polímeros Naturais

Os polímeros naturais são aqueles normalmente encontrados na natureza, sendo produzidos por organismos vivos e, neste caso, são chamados de biopolímeros. Dentre os polímeros naturais estão os poli(hidroxicanoatos) (PHAs) (FARIA, 2009).

Os PHAs pertencem à família de poliésteres de ácidos hidroxicanoicos acumulados por diversas bactérias, na forma de grânulos intracelulares de reserva de carbono e energia, que atingem até 80% de massa seca da biomassa bacteriana (ANDERSON e DAWES, 1990; GOMEZ et al., 1993; STEINBÜCHEL, 1991; SUDESH et al., 2000). Em geral, a síntese de PHA por bactérias em um meio nutritivo ocorre quando há excesso de fonte de carbono e a limitação de pelo menos um nutriente necessário à multiplicação das células (N, P, Mg, Fe etc.) (ANDERSON e DAWES, 1990; BRANDL et al., 1990; STEINBÜCHEL e VALENTIN, 1995).

Os polímeros naturais são biodegradáveis no estado nativo, alguns deles têm ciclo de vida relativamente curto, como no caso das ligninas. A título de exemplo, cita-se os poliosídeos e derivados (celulose, amido, goma, quitina,.etc); as proteínas (colágeno, gelatina e caseína) e a borracha natural. Alguns são frequentemente usados para a fabricação de materiais de embalagem. A fim de melhorar a qualidade dos papéis, duas outras matérias-primas intervêm na composição: o amido e o caulino (VALETTE e de CHOUDENS, 1989).

O uso de enzimas para síntese de polímeros in vitro tem sido ativamente estudado na última década. A catálise enzimática tem fornecido uma nova estratégia sintética para a produção de polímeros. Por outro lado, os catalisadores organometálicos derivados de Zn, Al, Sn ou Ge podem ser tóxicos na natureza. Eles podem se concentrar na matriz remanescente depois da degradação do polímero (THTSSON e SRIVASTAVA, 2008).

b) Polímeros Sintéticos

Os polímeros sintéticos constituem provavelmente a via mais difícil do ponto de vista das considerações feitas sobre os polímeros biodegradáveis. O caminho é aquele da incorporação de ligações lábeis, tais como: éster ou amida nas cadeias principais para imitar as substâncias naturais utilizadas na produção de materiais biodegradáveis como os poliuretanos lineares, poliamidas e álcool polivinílico (SEBIO, 2003). A biodegradabilidade

relativa desses polímeros é devida à presença de grupamentos sensíveis à hidrólise enzimática nas cadeias carbônicas (LIN et al, 1996.)

Muitos dos plásticos, borrachas e materiais fibrosos que nos são úteis nos dias de hoje consistem em polímeros sintéticos. Os materiais sintéticos podem ser produzidos de maneira barata, e as suas propriedades podem ser aprimoradas num nível em que muitas delas são superiores às suas contrapartes naturais (CALLISTER, 2002).

Os poliésteres alifáticos (compostos não cíclicos) são, deste modo, particularmente os mais interessantes, pois foram reconhecidos como os mais facilmente biodegradáveis de todos os polímeros sintéticos (VERT, 1991).

Esses polímeros, em particular os poli- α -hidroxiácidos como os poli-ácido glicólico (HO-CH₂-COOH) (PGA), os poli-L-ácidos lácticos, (HO-CH (CH₃)COOH) (PLLA) e os poli- ϵ -caprolactona, (PCL) são sintetizados por via química a partir dos monômeros de ácidos (TOKIWA, 1989).

3.1.2 Estrutura dos polímeros

As cadeias poliméricas podem apresentar variações quanto à estrutura (linear, ramificada, com ligações cruzadas e em rede), tipo (homopolímeros e copolímeros), forma de obtenção (polímeros de condensação e polímeros de adição) e mecanismo de reação (polimerização em etapas e polimerização em cadeia). Quando os meros são ligados entre si formando uma unidade contínua, a cadeia é linear, quando as unidades são conectadas de forma tridimensional formando uma rede (ou mais redes unidas), o polímero é reticulado ou contém ligações cruzadas; e quando uma cadeia possui ramificações laterais, o polímero é chamado de ramificado ou não-linear. A Figura 1 mostra as quatro formas básicas de estrutura molecular para a formação polimérica: linear, ramificada, cruzada e em rede (AKCELRUD, 2007).

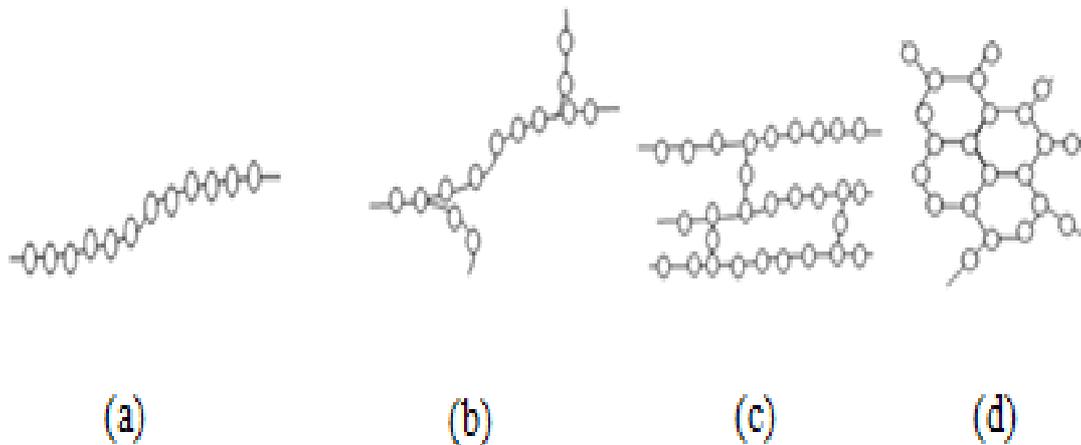


Figura 1 - Representação esquemática de estruturas moleculares das cadeias poliméricas. (a) Lineares, (b) Ramificadas, (c) Com ligações cruzadas e (d) Em rede. Os círculos representam as unidades monoméricas que se repetem (CALLISTER, 2002).

3.1.3. Tipos de polímeros

Quanto ao número de monômeros envolvidos na formação da cadeia macromolecular, os polímeros podem ser classificados de duas maneiras: polímeros preparados a partir de um único monômero, que são chamados de homopolímeros; e polímeros em que dois ou mais monômeros são empregados, os copolímeros. Nestes últimos, as unidades monoméricas podem ser distribuídas aleatoriamente (copolímero randômico ou aleatório), de modo alternado (copolímero alternado), ou em blocos (copolímero em bloco) e, ainda, um polímero pode ramificar a cadeia de um outro polímero graftizado ou enxertado. A Figura 2 apresenta uma representação esquemática da classificação dos polímeros quanto aos monômeros envolvidos na sua formação (STEVENS, 1999; MANO, 1999 apud SANTOS, 2011).

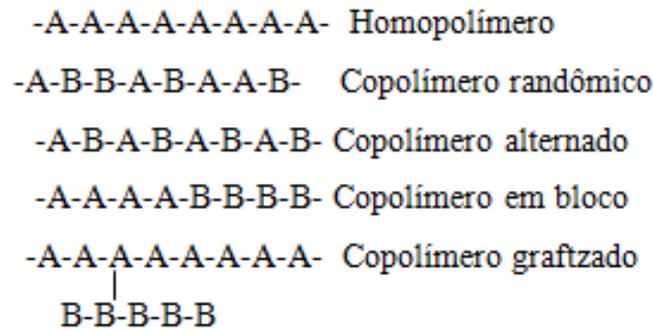


Figura 2 - Representação esquemática de um homopolímero e de copolímeros (RAMOS, 2007).

Carothers, em 1929, propôs uma classificação dos polímeros em duas categorias: polímeros de condensação e polímeros de adição. Os polímeros de condensação são aqueles formados a partir de reações de condensação com eliminação de pequenas moléculas: água, ácido clorídrico ou metanol (por exemplo, formação de poliamidas, policarbonatos e poliuretano). Já os polímeros de adição são formados sem que haja saída de moléculas orgânicas, sendo a estrutura da unidade repetitiva idêntica àquela do monômero (por exemplo, poliestireno, polietileno e poli(cloreto de vinila). A Figura 3 apresenta uma representação esquemática das reações para a obtenção de polímeros de condensação e de polímeros de adição (AKCELRUD, 2007).

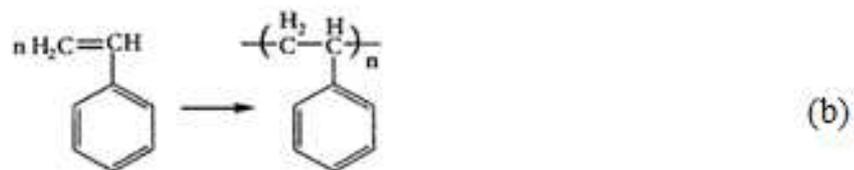
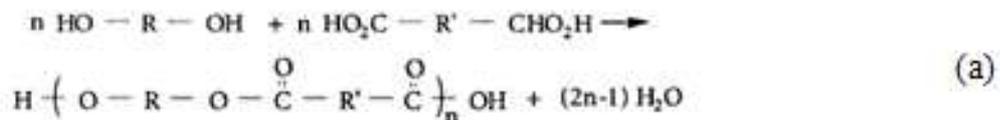


Figura 3 - Representação das reações de polimerização: (a) Formação de poliéster por meio da policondensação entre um diol e um diácido, com eliminação de água. Se R = (CH₂)₂ e R' = fenila, o poliéster formado é o poli(tereftalato de etileno). (b) Polimerização do estireno exemplificando a formação de um polímero de adição, em que n é o grau de polimerização do polímero resultante (AKCELRUD, 2007).

Rotular um polímero como de adição ou de condensação pode ser inadequado, pois alguns polímeros podem ser sintetizados a partir de reagentes diferentes, e, conseqüentemente, pela classificação de Carothers, receberiam classificações diferentes dependendo da rota sintética utilizada (STEVENS, 1999). Para evitar interpretação errônea,

a classificação proposta por Flory surge baseada no mecanismo da reação, dividindo em duas classes de polímeros: polimerização em etapas (inclui todos os polímeros de condensação e aqueles formados por meio de etapas definidas) e polimerização em cadeia (essas reações requerem a formação de um centro ativo ao qual as moléculas de monômero adicionam-se para formar o polímero final). A Figura 4 mostra exemplos de polimerização em cadeia e de reação em etapas (AKCELRUD, 2007).

3.1.4 Propriedades dos polímeros

As propriedades dos polímeros dependem da estrutura química do material processado, tais como: estrutura e massa molar, da composição do material; da densidade; do grau de cristalinidade; das temperaturas de transições físicas; etc. Assim, as propriedades mecânicas podem ser quantificadas através de métodos estabelecidos nas normas técnicas (ASTM D 882-00, 2001).

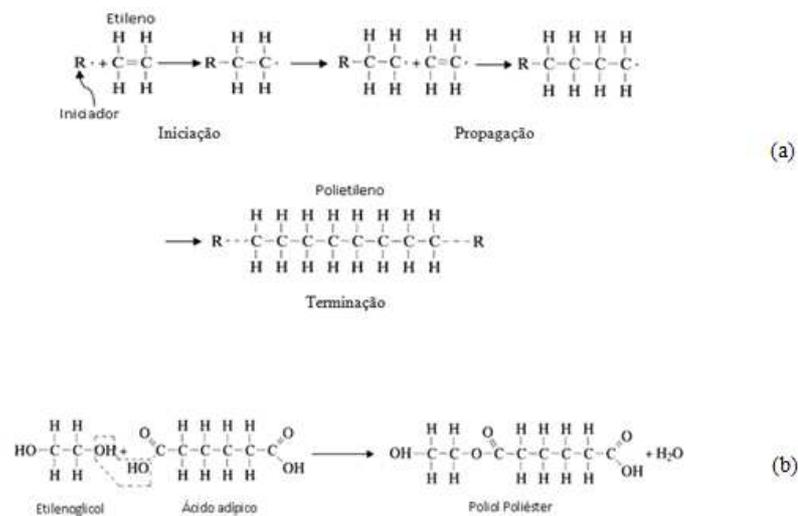


Figura 4 – (a) Polimerização em cadeia para a formação de polietileno. Esse processo envolve três estágios distintos (iniciação, propagação e terminação), em que na iniciação uma espécie catalisadora reage com o monômero, formando um complexo ativo. Na propagação ocorre o crescimento linear da molécula à medida que unidades do monômero se fixam umas às outras em sucessão. A etapa de terminação se encerra quando as extremidades ativas de duas cadeias que se propagam reagem entre si, formando uma molécula não-reativa. (b) Reação em etapas representada pela formação de um poliéster. O polímero é formado mediante reações intermoleculares entre o etilenoglicol e o ácido adípico, com eliminação de água (CALLISTER, 2002).

As propriedades devem ser determinadas de forma confiável e reprodutível. Para tanto, é necessário estabelecer sempre que possível, correlações entre os resultados de ensaios em laboratório em condições padronizadas com o desempenho esperado do material no seu ciclo de fabricação e de uso (SEBIO, 2003).

Para estabelecer tais correlações, é necessário conhecer as diferenças entre os ensaios, em relação às variáveis externas que afetam o comportamento mecânico dos materiais poliméricos: temperatura, tempo ou velocidade de deformação, tipo de sollicitação e as condições ambientais como, por exemplo, o efeito da umidade relativa sobre as propriedades de um polímero hidrofílico (AGNELLI, 2001).

3.1.5 Biodegradação e biocompatibilidade

Na sociedade atual, o uso de materiais plásticos é muito frequente, devido o seu baixo custo e grande durabilidade. Devido à maneira incorreta de descarte destes, seu uso, no entanto, vem tornando-se um sério problema ambiental. Os plásticos permanecem no meio ambiente por longo tempo, apresentando baixa degradação, prejudicando assim a circulação de gases. Com isso, desenvolveram-se alternativas para resolver ou minimizar os problemas gerados pelos plásticos. Os polihidroxicanoatos são um exemplo de polímeros que apresentam propriedades termoplásticas interessantes e são biodegradáveis (GOMEZ e BUENO-NETTO, 1997).

A biodegradação é um processo natural pelo qual os compostos orgânicos no meio ambiente são convertidos em compostos simples, mineralizados e redistribuídos através dos ciclos tais como, ciclo do carbono, nitrogênio e enxofre. Os microrganismos são os principais responsáveis pela degradação (CHANDRA e RUSTGI, 1998).

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

3.1.6 Fatores de degradação dos polímeros

Diversas definições têm sido utilizadas para degradação, no entanto, uma delas se destaca como sendo um processo irreversível que leva a uma alteração significativa no material, sendo caracterizada tipicamente pela mudança nas suas características (massa molar, estrutura química e força mecânica) e ainda pela sua fragmentação (LI, VERT, 1995; MARIANI, 2005).

Após o depósito no solo e compostagem em aterro, os materiais podem ser degradados por fotodegradação (luz solar e catálise), quimiodegradação (água e oxigênio), biodegradação (microorganismos e enzimas), degradação física (vento e macro organismo) ou por combinação desses fatores com substâncias ambientalmente inofensivas ou com produtos de menores moléculas que mais tarde podem ser metabolizados por microorganismos. Nos melhores casos, esses materiais devem se transformar em biomassa aeróbia microbiana com produção de H₂O e CO₂ ou em biomassa anaeróbia com produção de hidrocarbonetos, ácidos orgânicos e álcoois (RAPRA, 1989).

A fotodegradação ou foto-oxidação ocorre sob exposição à luz solar na presença de O₂ do ar. Ela pode ser aumentada pela adição de catalisadores como os sais metálicos (Co, Fe, Mg, Zn, etc) de ácidos graxos insaturados e aditivos pró-oxidantes. O problema maior é o de formular os materiais de tal maneira que eles degradem depois de certo tempo de exposição à luz solar. Deve-se mencionar que foram identificados fotometabólitos tóxicos em alguns desses polímeros fotodegradáveis que já estão disponíveis no mercado (SEBIO, 2003).

Na degradação química, os polímeros clássicos (PE, PP, PS, etc) podem ser quimicamente modificados pela implantação de um grupo funcional como C=O na cadeia do polímero com objetivo de conseguir acelerar uma degradação fotoquímica e química (hidrólise e oxidação), como observaram RÖPER & KOCH (1990).

A degradação biológica ou biodegradação ocorre por ação enzimática de microorganismos vivos, tais como: as bactérias, leveduras e fungos. A degradação física ocorre sob ação do vento pela corrosão do material, ou por ação de insetos, animais e peixes que consomem o material como fonte de alimento podendo lhes ser tóxicos. A demanda por plásticos degradáveis está intrinsecamente ligada aos fatores relacionados ao ambiente, tais como: as atitudes dos consumidores, as legislações e as ações reguladoras. O problema ecológico que envolve os materiais plásticos sintéticos desperta um interesse muito grande na Europa e nos EUA. Por exemplo, na Itália, já há projeto de lei que sugere que todos os plásticos utilizados em mercadorias não duráveis deverão ser degradáveis. As indústrias marítimas assinaram o tratado "MARPOL" que passaria a vigorar a partir do dia 1o

de janeiro de 1994 proibindo o uso de embalagens não degradáveis nas embarcações em alto mar (SEBIO, 2003).

Por meio do Comitê para Plásticos Ambientalmente Degradáveis, a American Society for Testing and Materials (ASTM), tem proposto vários métodos de análise e de acompanhamento da biodegradação de polímeros. Normas têm sido estabelecidas para cada um desses métodos propostos, visando à padronização de procedimentos relacionados à biodegradação (MEZZANOTE et al.; 2005).

3.1.7 Processo de degradação de biopolímeros

Segundo estabelecido pela American Standard for Testing and Methods (ASTM-D-883), polímeros biodegradáveis são polímeros nos quais a degradação resulta primeiramente da ação de microrganismos tais como bactérias, fungos e algas de ocorrência natural. Em geral, derivam desse processo CO₂, CH₄, componentes celulares microbianos e outros produtos (SWIFT, 1995).

A divisão da cadeia principal, ou seja, a produção de intermediários de baixa massa molar por diferentes formas: abiótica (sem a presença de seres vivos) ou por organismos vivos, ilustra o primeiro estágio de degradação (Figura 5).

Na segunda etapa, os microrganismos (bactérias e fungos), atuando como agentes degradativos da natureza são os responsáveis pela degradação biótica chegando até o processo de mineralização, sendo esta a última etapa da transformação biológica dos materiais orgânicos no solo, que ocorre simultaneamente com a imobilização de nutrientes minerais para atender à demanda nutricional da microbiota decompositora. Essa etapa pode eliminar, por completo, o polímero original no meio ambiente, produzindo gás carbônico e água em processos aeróbicos ou, em condições anaeróbicas, metano, gás carbônico e água (ROSA et al., 2003; ROSA; PANTANO FILHO, 2003; INNOCENTINI-MEI; MARIANI, 2005; KRZAN et al., 2006; VOLOVA et al., 2007).

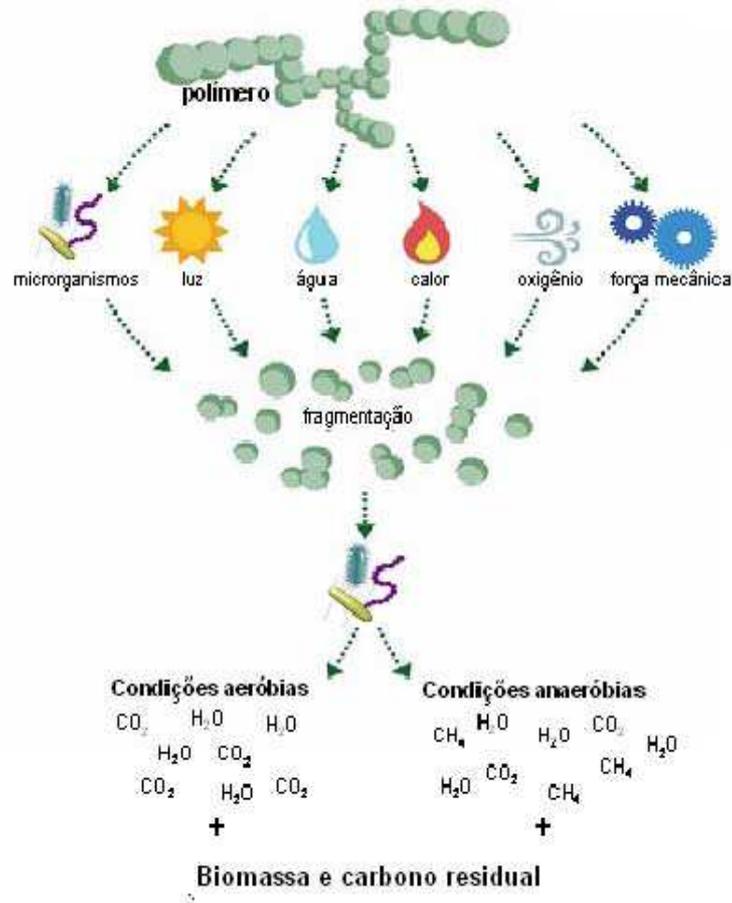


Figura 5 - Degradação de um polímero através de diferentes processos.

Fonte: Adaptado de Innocentini-Mei e Mariani (2005)

3.1.8 Mercado de biopolímeros

Há aproximadamente 20 anos, os polímeros degradáveis estão comercialmente disponíveis. No entanto, ainda não são capazes de competir com os polímeros tradicionais, devido ao seu custo, que vem diminuindo ao longo dos anos, mas que ainda é alto comparativamente aos polímeros produzidos a partir do petróleo (DOTY, 2005; MEZZANOTE et al.; 2005; VOLOVA et al., 2007).

No início do desenvolvimento dos materiais biodegradáveis, uma quantidade expressiva de amido era utilizada na composição juntamente com polietileno. Como a base polimérica não sofria degradação, apenas desintegrava em pequenos pedaços, só degradando, portanto, a porção do amido, estes produtos foram duramente criticados (KTISTI, 2005).

No mercado atual, diversos plásticos com características biodegradáveis já estão disponíveis tais como polihidroxialcanoatos (PHAs), os polilactatos (PLA) e os poliglicolatos (PGA) (SRIDEWI; BHUBALAN; SUDESH, 2006; SURIAMONGKOL et al., 2007)

Em 2002, o mercado dos biopolímeros, era da ordem de 60 mil toneladas com preço de comercialização de US\$ 4/kg. A taxa de crescimento deste mercado é na ordem de 20% ao ano e custos de produção decresceram para cerca de US\$ 2/kg. O preço de venda do produto é o obstáculo principal para sua entrada no mercado, apontando-se um preço teto de cerca de US\$ 2/kg (BORSCHIVER, 2008).

No uso cotidiano dos brasileiros, os polímeros degradáveis são raridades, no entanto, o país já exporta de 50 a 60 toneladas por ano de poli(hidroxibutirato) (PHB) para Europa, Japão e Estados Unidos. O PHB é obtido a partir de bactéria que usa o açúcar (sacarose) para transformá-lo em plástico (SILVA; RODRIGUES, 2001). A área de polímeros biodegradáveis é um campo em desenvolvimento, com crescente utilização nos mais variados setores, embora ainda sejam verificadas poucas patentes (8,9%) relacionadas com aplicações (FALCONE; AGNELLI; FARIA, 2007).

3.2 Poli(ϵ -caprolactona)

A poli(ϵ -caprolactona) (PCL), também chamada de poli(6-hidroxihexanoato) (P(6-HH)), é um poliéster sintético de cadeia linear que é de grande interesse para a área de biomateriais devido às suas propriedades mecânicas e sua biocompatibilidade (JELLINEK e KACHI, 1989; ANDRADE et al., 2002 apud ALVES, 2008). É um polímero de caráter hidrofóbico, possui baixa temperatura de fusão (55 a 60°C). A PCL é conhecida pela sua capacidade de formar blendas com outros polímeros (MARIANI, 2005; DENG et al.; 2006). Sua biodegradabilidade é devida ao grupo funcional éster presente na estrutura de sua molécula, que pode ser hidrolizado pela ação de enzimas microbianas (OHTAKI et al.; 1998).

A Figura 6 ilustra a poli(ϵ -caprolactona) em uma de suas formas de comercialização, como flocos semi-cristalinos de aproximadamente 3 mm de diâmetro.



Figura 6 - Fotografia em tamanho natural de flocos de poli(ϵ -caprolactona) de aproximadamente 3 mm de diâmetro e massa molar entre 70000 e 90000 g/mol (SANTOS, 2011).

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

Industrialmente, o custo de produção da poli(ϵ -caprolactona) não é muito elevado, uma vez que pode ser obtido por polimerização da ϵ -caprolactona (CL), um monômero relativamente barato, pela tradicional reação de oxidação Bayer-Villing a partir de ciclohexanona (ALVES, 2008). A Figura 7 mostra a estrutura química do monômero ϵ -caprolactona e do polímero poli(ϵ -caprolactona).

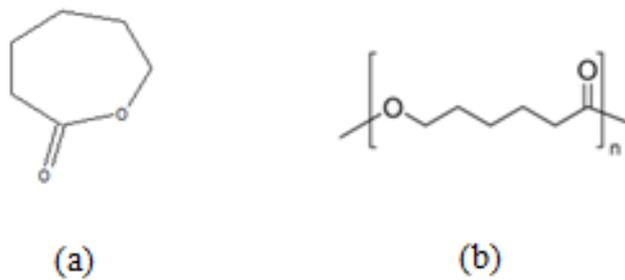


Figura 7 - (a) Estrutura química da ϵ -caprolactona na sua forma cíclica, com um anel de sete membros e fórmula molecular $C_6H_{10}O_2$. (b) Estrutura da poli(ϵ -caprolactona) representada pela sua unidade monomérica, a ϵ -caprolactona, com o anel aberto (SIGMA-ALDRICH, 2010).

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

Estudos sobre a polimerização por abertura de anel (ciclo-adição) da ϵ -caprolactona (CL) foram concentrados principalmente na determinação de estruturas de centros ativos e nas relações entre as cinéticas de propagação e reações secundárias (como transesterificação inter ou intramolecular) (SLOMKOWSKI et al., 1998 apud SANTOS, 2011). Informações mais detalhadas sobre polimerização da ϵ -caprolactona estão no item 3.5.

A PCL sofre degradação microbiana e enzimática devido às suas ligações ésteres, passíveis à hidrólise, seguidas de cadeia alifática. No entanto, a taxa de degradação é bastante lenta (de 2 a 3 anos) em relação a outros polímeros biodegradáveis, como o PHB. A degradação da PCL foi estudada em diversos meios como água de rio, de lago e de mar, lodo de esgoto e solo, indicando que quanto maior a quantidade de microorganismos no meio, maior a taxa de degradação da PCL. Ainda, a degradação da PCL em ambientes aeróbicos é mais rápida do que em ambientes anaeróbicos (ALVES, 2008).

3.3 Fluidos supercríticos

A aplicação de solventes em condições supercríticas ou próximas ao seu ponto crítico é baseada na observação experimental da característica que muitos gases

apresentam de melhorar significativamente o seu poder de solubilização quando submetidos a altas pressões (McHugh e Krukoni, 1994).

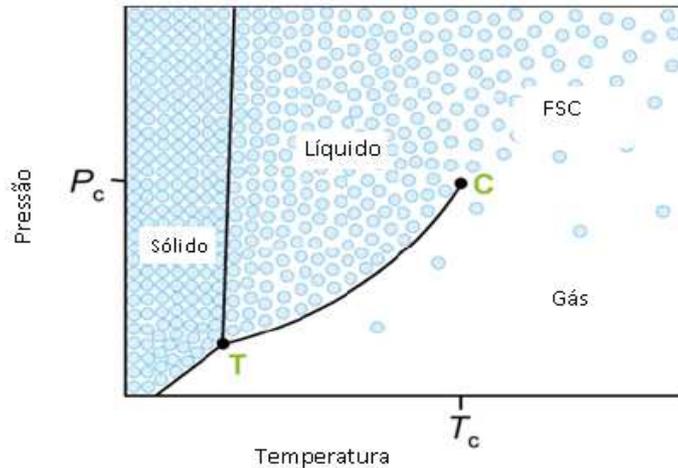


Figura 8 – Diagrama p-t para um fluido puro (cooper, 2000).

O uso de fluidos comprimidos como solventes para reações de catálise enzimática, investigados primeiramente por Randolph et al. (1985), Hammond et al. (1985) e Nakamura et al. (1985), é uma área de pesquisa muito fértil que teve grande destaque na década de 80. A facilidade de alteração das propriedades físicas e de transporte do solvente pela mudança da pressão e/ou temperatura é peculiar na proximidade do seu ponto crítico.

Quando a temperatura e pressão a que é submetido um fluido encontram-se acima de seus valores de temperatura crítica (T_c) e pressão crítica (P_c), o fluido é denominado supercrítico (FSC) (Figura 8). É bem estabelecido que as propriedades dos fluidos supercríticos apresentam-se como intermediárias entre aquelas do estado líquido e gasoso. Por exemplo, as densidades dos fluidos supercríticos são comparáveis as dos líquidos, enquanto a difusividade e a viscosidade são comparáveis as dos gases. Tais propriedades de transporte, semelhantes a dos gases, facilitam as taxas de transferência de massa entre reagentes e catalisadores. (Messiano et al., 1999).

Nos últimos anos, a utilização dos denominados fluidos supercríticos tem se constituído em desafio interessante para os meios industrial e acadêmico. A principal vantagem do emprego destes vem de sua grande versatilidade de propriedades físico-químicas, permitindo a sua utilização em reações químicas ou solubilização seletiva de espécies. Embora os FSC tenham sido empregados nas primeiras investigações principalmente como agentes/solventes de extração de óleos/extratos de matrizes vegetais, estudos recentes têm considerado o uso de FSC como meio de reação. Além disso, alguns

desses FSC apresentam como vantagem a alta disponibilidade, o baixo custo, não são poluentes e desta forma candidatando-se como substituto aos solventes tóxicos. O dióxido de carbono é um exemplo de solvente que pode ser usado no estado supercrítico, constituindo-se como um solvente de grande interesse no desenvolvimento de novas tecnologias limpas (BERGEOUT, 2004).

No que diz respeito a sua utilização no campo de polímeros, dois tipos de estudos podem ser distinguidos. O primeiro trata o comportamento de fases de polímeros em vários FSC (KIRBY et al., 1999) teve como seu principal objetivo investigar as interações ocorrendo entre o fluido e a macromolécula. Por exemplo, Kiran e Saraf estudaram o comportamento de poliestireno em FSC, como o butano, pentano, propano, etano, bem como em suas misturas (SARAF, 1990 e KIRAN, 1988).

Em todos os casos, dependendo do tipo de polímero e solvente, o sistema pode exibir transição líquido-líquido denominada de temperatura crítica de solução superior (UCST - upper critical solution temperature) ou inferior (LCST - lower critical solution temperature). Com o desenvolvimento de tecnologias de alta pressão, foi possível caracterizar os sistemas formados por cromatografia em um aparelho equipado com um detector de índice de refração (BUHLER e ZHOU, 1998).

Experiências têm revelado que os polímeros tendem a se auto-organizar em agregados, como micelas. Foi mostrado que é possível modificar quimicamente polímeros, mesmo se eles não forem totalmente solúveis no fluido em questão (KENDALL, 1999 e COOPER, 2000).

Até o presente momento, a maioria dos estudos sobre polimerização em FSC tem abordado a polimerização de radicais livres de monômeros vinílicos, sendo o CO₂ o solvente preferencialmente usado. Um benefício claro em tais sistemas seria a obtenção de polímeros sem qualquer vestígio de solvente orgânico ou monômero residual frequentemente presentes nos processos clássicos (MINGOTAUD et al., 1999 e 2000).

Na catálise enzimática, o uso de dióxido de carbono supercrítico como solvente, é de grande interesse devido à baixa polaridade do meio, podendo dissolver preferencialmente compostos hidrofóbicos. O dióxido de carbono supercrítico é considerado um solvente não polar, e comparado aos solventes orgânicos, o CO₂ não é tóxico, é não inflamável e apresenta risco ambiental consideravelmente menor. Apresenta ainda vantagem em processos industriais como ausência de traços de solvente no produto final, a possibilidade de reciclagem do efluente gasoso, a facilidade de separação do solvente da amostra e propriedades favoráveis de transporte que podem acelerar a transferência de massa em reações enzimáticas (ANDRADE, 2008).

3.4. Lipases como catalisadores

As lipases são classificadas como hidrolases e ocorrem largamente na natureza onde elas catalisam a hidrólise de ésteres de gliceróis e cadeias longas de ácidos graxos, liberando moléculas de álcool e ácido (EISENMENGER e REYES-DE-CORCUERA, 2009). Com a ampliação do potencial de aplicação das enzimas como catalisadores em processos industriais, o interesse por tecnologias enzimáticas vem aumentando gradativamente, principalmente nas áreas de proteínas e enzimologia em meios não convencionais (FIAMETTI, 2008).

A alta eficiência na conversão de substratos devido à sua alta seletividade para uma dada transformação orgânica e possibilidade de reciclagem do catalisador, apresenta-se como vantagem. As enzimas têm a habilidade de serem usadas na maioria dos meios reacionais (exemplos de meios reacionais alternativos incluem vários solventes orgânicos, misturas aquosas, misturas azeotrópicas e fluidos supercríticos), além de evitarem o uso de catalisadores potencialmente tóxicos (JUAIS, 2009). O reconhecimento dessas vantagens tem proporcionado um aumento considerável na produção e comercialização de lipases, resultando no desenvolvimento de tecnologias alternativas consistentes para utilização no setor industrial (CASTRO et al., 2006). Certamente, a CAL-B, que é a lipase de *Candida antarctica* – fração B (Figura 9), tem sido a lipase mais amplamente utilizada. Essa enzima tem uma característica que é a habilidade do sítio ativo da enzima em catalisar diferentes transformações químicas (JUAIS, 2009).

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

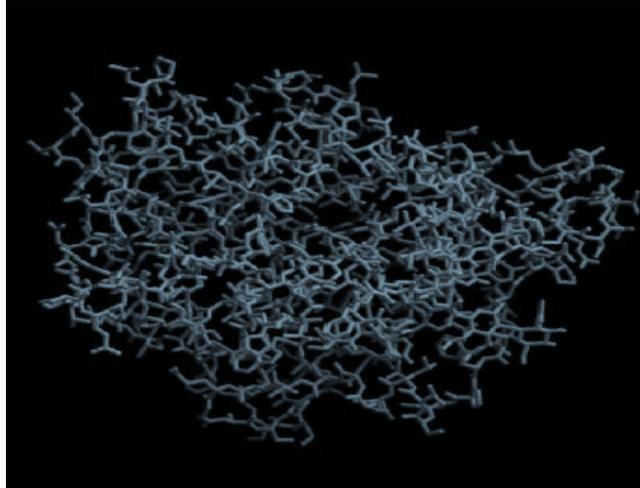


Figura 9 – Estrutura tridimensional da CAL-B (SANTOS, 2011)

3.5 Polimerização por abertura do anel “Ring-Opening Polimerization” (ROP)

A poli(ϵ -caprolactona) e seus copolímeros podem ser sintetizados quimicamente através do método da policondensação e do método da polimerização pela abertura do anel de ésteres cíclicos (lactonas, lactídeos e glicolídeos), o qual permite preparar poliésteres de elevada massa molar (SANTOS, 2011).

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

Thurecht et al. (2006) relataram ainda a cinética de polimerização enzimática pela abertura do anel de caprolactona em dióxido de carbono supercrítico utilizando a lipase de *Candida antarctica* fração B como catalisador, e os resultados mostraram que polímeros de alto peso molecular podem ser obtidos.

Albertsson e Srivastava (2008) propuseram um mecanismo para a polimerização de lactonas por abertura de anel, conforme descrito na Figura 10.

Na etapa de iniciação, a lipase faz um ataque nucleofílico no monômero, formando um complexo ativo com a enzima (EAM). A água presente no meio reativo, que se acredita estar presente na enzima, faz um ataque nucleofílico a esse complexo EAM, liberando a enzima e originando um polímero de cadeia curta, o ácido ω -hidróxi-carboxílico. A etapa de

propagação nada mais é do que o crescimento da cadeia do ácido ω -hidróxi-carboxílico quando esse polímero faz sucessivos ataques nucleofílicos nos complexos ativos formados. A polimerização se encerra quando duas cadeias de polímeros reagem, tornando-se inativa (ALBERTSSON e SRIVASTAVA, 2008).

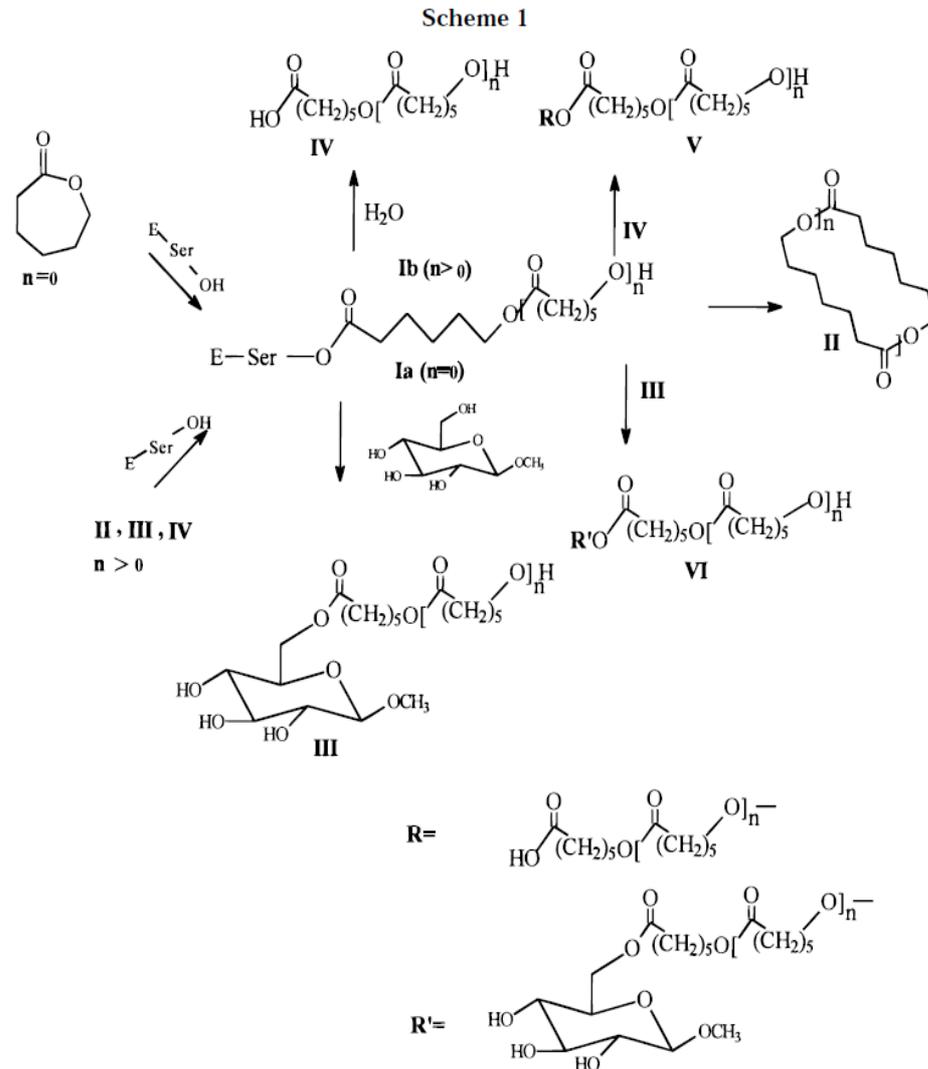


Figura 10 - Mecanismo de polimerização de lactonas

3.6 Considerações a respeito do estado da arte

Nos últimos anos, um esforço considerável tem sido dirigido para a produção de polímeros biodegradáveis e revestimentos poliméricos de partículas, com larga aplicação na indústria farmacêutica, alimentos, agrotóxicos, cosméticos e indústrias biomédicas.

A literatura aponta que o Brasil possui um crescente acúmulo de lixo, proveniente de plásticos sintéticos que agridem o ecossistema, principalmente o solo, devido ao longo tempo de permanência no ambiente. As áreas destinadas a receber toneladas de resíduos sem, contudo, terem uma infra-estrutura capaz de evitar os problemas oriundos desta deposição, terão o uso futuro comprometido. Avalia-se que paralelo ao excedente uso de materiais poliméricos, verifica-se a crescente demanda destes para a produção de plástico. Existe então, uma necessidade emergente de implantação de produção de biopolímeros. Diante deste cenário, o uso de biopolímeros torna-se uma alternativa relevante no contexto nacional atual.

O emprego de enzimas como catalisadores nas reações de produção de polímeros apresenta algumas vantagens em relação aos catalisadores químicos. Enquanto catalisadores tradicionais geralmente contêm espécies metálicas tóxicas, enzimas são uma opção ecologicamente correta. Vários pesquisadores relatam o uso de enzimas aplicadas às reações de transesterificação em solventes orgânicos, processo este desvantajoso no que diz respeito ao uso excessivo de solvente.

A maioria dos estudos encontrados na literatura refere-se ao emprego de dióxido de carbono como solvente, devido à baixa polaridade do meio, podendo dissolver preferencialmente compostos hidrofóbicos, além de apresentar vantagem como: versatilidade de propriedades físico-químicas, permitindo a sua utilização em reações químicas ou solubilização seletiva de espécies. O uso do dióxido de carbono supercrítico também possui apelo ambiental, uma vez que pode ser facilmente separado pela depressurização do sistema e pode ser reutilizado no processo.

Diante destes aspectos é que se justifica a realização do presente trabalho, cujo objetivo maior é investigar a produção enzimática de poli- ϵ -caprolactona em dióxido de carbono supercrítico.

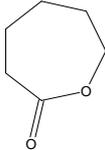
4 MATERIAIS E MÉTODOS

A produção de poli(ϵ -caprolactona) foi realizada em meio contendo dióxido de carbono supercrítico, utilizando uma lipase foi realizada em sistema de batelada, avaliando-se os efeitos das seguintes variáveis da reação de polimerização: teor mássico de enzima em relação ao monômero, pressão do sistema e razão mássica solvente/substrato, além dos experimentos para a determinação da atividade enzimática da enzima comercial utilizada (Novozym 435) com a finalidade de verificar o impacto das condições reacionais sobre a enzima. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Termodinâmica Aplicada da Universidade Regional Integrada, Campus de Erechim/RS.

4.1 Materiais

A lactona utilizada para as reações de polimerização foi a ϵ -caprolactona com 97% de pureza, adquirida da Sigma-Aldrich com especificações indicadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Características da lactona estudada.

Lactona	Fórmula molecular	Massa molar (g/gmol)	Estrutura molecular plana	Pureza (%)
ϵ -caprolactona	C ₆ H ₁₀ O ₂	114,14		97

Fonte: Sigma-Aldrich, 2010.

O catalisador empregado foi a lipase comercial imobilizada *Candida antarctica*, a Novozym 435, fornecida pela Novozymes S/A (Figura 11). O dióxido de carbono (99,9% de pureza) utilizado foi adquirido da White Martins S/A.



Figura 11 - Amostra da enzima utilizada nas reações, lipase comercial imobilizada *Candida antarctica*, a Novozym 435, fornecida pela Novozymes S/A.

Para a determinação da atividade enzimática foi utilizado ácido láurico (Vetec, 98% de pureza), álcool n-propílico (Synth, 99,5% de pureza), acetona (Quimex, 99,5% de pureza), álcool etílico (Quimex, 99,5% de pureza) e hidróxido de sódio (Quimex 99,5% de pureza). Conforme especificações fornecidas pelo fabricante, a referida lipase imobilizada possui, diâmetro médio de partículas de 0,4 mm, área superficial BET de 130 m²/g, diâmetro médio de poros de 15 nm e volume médio de poros de 0,5 ml/g. Também, de acordo com o fabricante e considerando experiência prévia do grupo de pesquisadores da Engenharia de Alimentos da URI-Campus de Erechim, a temperatura de 65°C, se apresenta como a que propicia melhor performance da enzima Novozym 435 (OLIVEIRA et al., 2006; FIAMETTI, 2008).

4.2 Procedimento experimental

As reações de polimerização foram conduzidas em um reator de volume variável com visualização. O dispositivo experimental consiste de um reator com um volume interno máximo de 27 mL, duas janelas de safira para observação visual da formação do polímero, um transdutor de pressão absoluta (DL 301, Smar, de Sertãozinho/SP/Brasil), com uma precisão de $\pm 0,03$ MPa e uma bomba de seringa (260 D, ISCO, Lincon/NE/EUA). A célula contém um pistão móvel que permite o controle da pressão dentro do reator. A enzima, Novozym 435, e o monômero, poli(ϵ -caprolactona), são pesados em balança analítica e adicionados ao reator que então é fechado. O dióxido de carbono é adicionado ao reator com auxílio da bomba de seringa. Sua massa é calculada de acordo com o volume

deslocado no reservatório encamisado da bomba levando em consideração a densidade do dióxido de carbono na temperatura e pressão da bomba. A temperatura do reator é mantida constante com o auxílio de um banho termostático, com água como fluido circulante em uma jaqueta em torno do reator. O sistema é mantido em agitação contínua, com a ajuda de um agitador magnético. As massas (enzima e monômero) adicionadas ao reator são calculadas para atingir um volume de aproximadamente 13 mL dentro do reator, nas condições de reação. Após a polimerização, o material foi solubilizado em THF (Fmaia 99%), filtrado para separar a enzima e precipitado em etanol (Merck, 99,9%). A suspensão de polímero foi então filtrada. O rendimento foi calculado tomando-se a massa de material precipitado com relação à massa de monômero utilizado na polimerização, expresso em porcentagem.

4.3 Determinação da atividade enzimática

A atividade enzimática foi avaliada seguindo metodologia descrita em Oliveira et al. (2006) e Fiametti (2008). A quantificação ocorre por meio da reação de esterificação entre o ácido láurico e o álcool n-propílico, na razão molar 3:1, à temperatura de 60°C com 5% (m/m) de enzima. A reação foi conduzida em um reator de vidro aberto com agitação magnética cuja temperatura é mantida a 60°C com o auxílio de um banho termostático. Foram retiradas alíquotas de 150 µL, em triplicata, do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20 mL da solução acetona/etanol 1:1. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada pela titulação de hidróxido de sódio 0,01M. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1µmol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas. A atividade enzimática residual foi calculada determinando-se a atividade enzimática final, com relação à inicial expressa em porcentagem.

$$A_r(\%) = \frac{A_f}{A_i} \times 100$$
, onde A_r denota atividade residual, A_f e A_i , representam, respectivamente, atividade final e inicial. Para o cálculo da perda ou ganho da atividade enzimática, a seguinte relação foi utilizada:

$$\text{Perda ou ganho de atividade (\%)} = \frac{\text{Atividade enzimática após a reação (U/g)}}{\text{Atividade enzimática antes da reação (U/g)}}$$

Portanto, valores abaixo de 100% indicam perda de atividade enquanto valores superiores a 100% indicam ganho de atividade. A partir daí é possível discutir se a atividade

da enzima diminuiu, aumentou ou se permaneceu a mesma, uma vez que atividade enzimática pode ser consideravelmente afetada pela temperatura e pressão (OLIVEIRA et al. 2006; KNEZ e HABULIN, 2002).



Figura 12 - Sistema composto de um banho termostático e reatores utilizados para a determinação da atividade enzimática.

4.4 Planejamento experimental

Para avaliar a influência das variáveis de processo na produção enzimática de poli(ϵ -caprolactona) em dióxido de carbono à alta pressão foi realizado um planejamento fatorial completo, totalizando 11 experimentos. As variáveis investigadas foram pressão de operação, porcentagem de enzima, com base na massa de substrato, e fração mássica solvente/substrato. O planejamento foi realizado à temperatura constante de 65°C (temperatura ótima da enzima) adotando duas horas de reação. A cinética de polimerização foi realizada a 120 bar, 65°C, fração mássica dióxido de carbono: ϵ -caprolactona de 2:1 e 5% de enzima (m/m) com experimentos destrutivos em tempos determinados até 20 horas. As pressões e frações solvente/ substrato foram escolhidas observando-se o diagrama de equilíbrio de fases entre o dióxido de carbono e o monômero, ϵ -caprolactona, apresentado por Bender et al. (2010). De acordo com o diagrama de equilíbrio de fases apresentado pelos autores, para a relação solvente:substrato de 2:1 ou inferiores e temperatura de 65°C, as pressões de 200 e 280 bar exibem região monofásica, enquanto a pressão de 120 bar apresenta-se como sistema bifásico, de imiscibilidade líquido-líquido, para a relação de 2:1, líquido-líquido para 1:1 e monofásica para 1:2. Os resultados foram analisados com o software Statistica 8.0 Statsoft Inc.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Esta seção apresenta os resultados obtidos para a produção de poli (ϵ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico catalisada pela lipase comercial Novozym 435.

A Tabela 2 mostra as condições de processo e os resultados de rendimento da reação de polimerização via execução do planejamento fatorial.

Tabela 2 - Resultados do planejamento para a produção de poli(ϵ -caprolactona) em CO₂ supercrítico catalisada por lipase para duas horas de reação e temperatura de 65°C.

Exp.	Pressão (bar)/ Densidade (g/cm ³)	[Enzima] (m/m%)	Fração Mássica (CO ₂ :caprolactona)	Rendimento (m/m%)	Ar (%)
1	120/ 0,3781	5	1:2	47	80
2	280/ 0,7865	5	1:2	39	94
3	120/ 0,3781	15	1:2	72	89
4	280/ 0,7865	15	1:2	63	86
5	120/ 0,3781	5	2:1	29	---a
6	280/ 0,7865	5	2:1	25	---a
7	120/ 0,3781	15	2:1	67	91
8	280/ 0,7865	15	2:1	76	74
9	200/ 0,7986	10	1:1	56	114
10	200/ 0,7986	10	1:1	56	91
11	200/ 0,7986	10	1:1	60	114

a Quantidade de amostra insuficiente para avaliação da atividade.

Os maiores rendimentos obtidos foram de 72% e 76% para 15% de teor de enzima, nas condições de 120 bar, razão solvente:substrato de 2:1, e 280 bar razão de 1:2, respectivamente. Foram realizadas também medidas de atividade enzimática para avaliar o efeito das condições de reação sobre a atividade da enzima. Como observado na Tabela 5.1, os resultados de atividade enzimática variaram de 74% a 114%. Considerando-se o desvio padrão do ponto central 116 ± 13 %, observa-se que não há perda que impossibilite, a princípio, a reutilização da enzima no processo de polimerização.

A respeito da influência das condições de processo quanto ao rendimento da polimerização foi realizada uma análise estatística do tipo ANOVA em que os níveis das variáveis foram avaliados para o intervalo de confiança de 95% ($p=0,05$). O diagrama de Pareto (Figura 13) mostra que a concentração de enzima foi a variável estatisticamente mais significativa para as faixas de condições de processo estudadas. Ainda, o efeito cruzado entre a concentração de enzima e a razão entre dióxido de carbono e ϵ -caprolactona apresentou um efeito significativo, ou seja, melhores resultados são obtidos associando-se altas concentrações de enzima à proporção entre dióxido de carbono e caprolactona de 2:1.

Segundo Kristofer et al. (2006), as melhores condições para a ROP em CO₂ supercrítico são alcançadas quando ocorre um equilíbrio entre o poder de solubilização do solvente e a temperatura ideal para a atividade da enzima. Uma vez que o sistema caprolactona e CO₂ exibem um comportamento de LCST (Low Critical Solution temperature), com o aumento da temperatura diminui-se a solubilidade do monômero no solvente (BENDER et al., 2010). No entanto, para temperaturas abaixo da ótima da enzima, esta apresenta uma redução em sua atividade.

Stassin et al., (2001), estudou a polimerização por abertura do anel de ϵ -caprolactona em dióxido de carbono supercrítico a 40°C sob uma pressão que variou de 210-215 bar. Nessas condições de temperatura moderada e de alta pressão, a densidade do dióxido de carbono supercrítico é suficientemente alta (> 0,75 kg / L) para solubilizar o monômero.

No entanto, um aspecto interessante do diagrama de Pareto é que a pressão, assim como a densidade do fluido solvente, não se mostrou uma variável significativa para a faixa estudada apesar de as reações realizadas a 120 bar terem ocorrido em uma região de imiscibilidade líquido-líquido. Segundo Loeker et al. (2004), para as reações de polimerização, trabalhar dentro da região de solubilidade permite que haja uma maior interação entre o monômero e a espécie iniciadora da reação, permitindo ao monômero se difundir rapidamente para o sítio ativo.

Deixando de lado momentaneamente o efeito cruzado entre a porcentagem de enzima e a fração, observa-se que apesar de não ser significativo com $p=0,05$, o efeito da variável razão mássica solvente substrato é negativo. Sendo assim, para as concentrações de enzima mais baixas, e portanto de interesse econômico, os rendimentos são maiores para menores quantidades de solvente com relação ao monômero, ou seja, para relações mássicas de 1:2.

O tempo de duas horas foi escolhido para proporcionar uma rápida resposta das melhores condições para polimerização (BERGEOT et al., 2004).

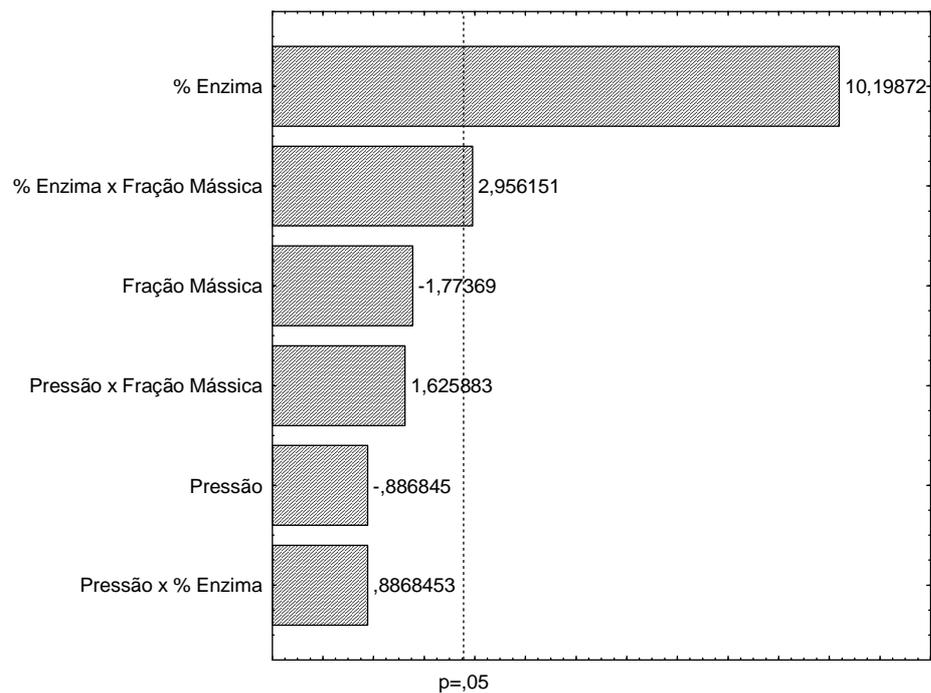


Figura 13 - Diagrama de Pareto para o rendimento da polimerização com nível de significância de 95%.

A partir dos resultados do planejamento, foram escolhidas as condições para a realização dos experimentos de cinética de polimerização da caprolactona com o intuito de avaliar o rendimento do processo de polimerização ao longo do tempo. Os resultados obtidos para os ensaios com 15% de enzima foram os melhores rendimentos alcançados (63%-76%). Devido ao alto custo da enzima, procurou-se buscar uma condição que se apresentasse promissora com uma menor quantidade de enzima (5%). Dentre os experimentos realizados no planejamento observa-se uma condição singular em que com apenas 5%, economicamente viável, obteve-se um rendimento de 47%,. Dentre as condições do ensaio 1 pode se citar o nível (-1) de pressão, propiciando economia energética, além do nível (-1) para a razão mássica entre dióxido de carbono e ϵ -caprolactona, propiciando economia de solvente. Desta forma, estas foram as condições utilizadas na cinética de polimerização.

A Figura 14 mostra os resultados da cinética de produção de poli(ϵ -caprolactona), em termos de rendimento (m/m%), bem como os valores da atividade residual da enzima a 120 bar, 65 °C, razão mássica dióxido de carbono: ϵ -caprolactona de 1:2 e 5% (m/m) de enzima. Pode-se observar pela Figura 15 que rendimentos similares aos obtidos utilizando-se 15 % de enzima (63% a 76% de conversão) foram alcançados com cerca de 8 a 12 horas de reação para a cinética com 5% de enzima, obtendo-se valores de 65% e 75%, respectivamente.

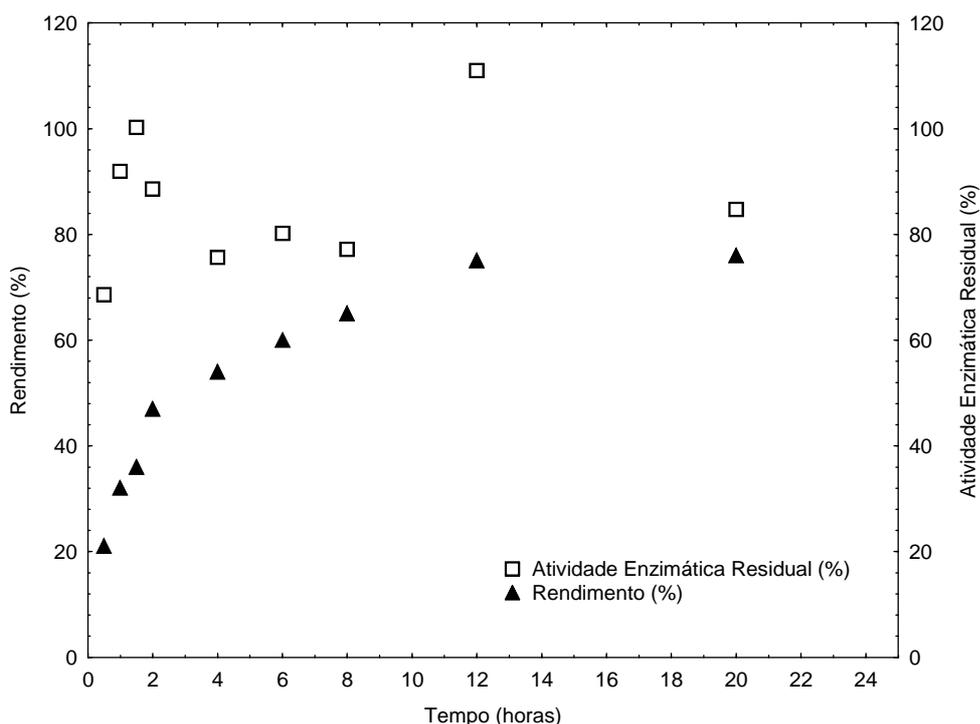


Figura 14 - Cinética de produção de poli(ϵ -caprolactona) e atividade enzimática residual a 120 bar, 65 °C, razão mássica CO₂: ϵ -caprolactona de 1:2 e 5 % (m/m) de enzima.

Loecker et al. (2004) alcançaram rendimentos de até 98% para a reação de polimerização a 138 bar, 65°C e 24 horas utilizando 10% de enzima. Além da maior quantidade de enzima no meio, outro fator que contribui para a diferença de rendimento é o método de separação do polímero. Isso pode justificar o menor rendimento obtido no presente trabalho. Outro ponto importante é o maior teor de água presente na amostra de monômero aqui utilizada quando comparado ao de Locker et al. (2004). Neste trabalho, o monômero foi utilizado sem prévia secagem visando economia de custos para um processo em larga escala. Segundo Turecht et al. (2006) a presença de umidade conduz a obtenção de maior fração de cadeias com menor massa molar, passíveis de remoção com a separação utilizando-se o solvente e anti-solvente.

Nota-se também que a atividade enzimática proporciona a possibilidade de reuso da enzima. Tendo em vista o elevado custo da enzima (em torno de U\$ 1,500.00/kg), pode ser mais vantajoso admitir maiores tempos de reação com menores quantidades de enzima. Uma detalhada análise de custo pode contribuir para esta decisão.

Tem sido demonstrado que a estabilidade e a atividade da CALB imobilizada permanecem elevadas, mesmo sob extremas condições físicas (Kristofer et al., 2006). Em 2004, Gross et al., demonstraram que a Novozym-435 perde pouca atividade e opera eficazmente para catalisar a polimerização de abertura de anel em CO₂ supercrítico, apesar das altas pressões intrinsecamente associadas com fluidos supercríticos.

A Figura 15 mostra a cinética de conversão e os resultados de rendimento da reação de polimerização.

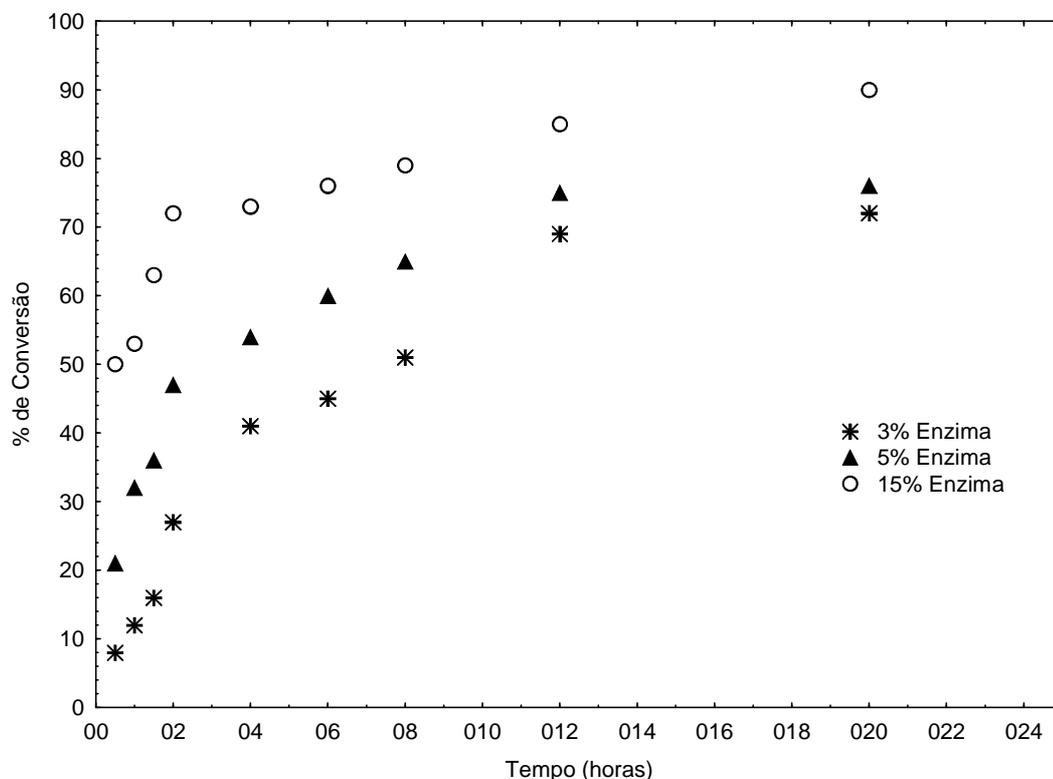


Figura 15 - Resultados da cinética de conversão para a polimerização da ϵ -caprolactona a 120 bar, 65 °C, fração mássica de CO₂: ϵ -caprolactona 2:1 e 3%, 5% e 15% de enzima.

A cinética de conversão para a polimerização da ϵ -caprolactona foi determinada em diferentes tempos que variaram de 30 minutos até 20 horas de reação. Os maiores rendimentos obtidos foram de 72%, 76% e 90% para as condições de 120 bar, 20 horas de reação a 65°C, 3%, 5% e 15% de enzima.

De acordo com AL-Azemi et al. (2002), a conversão de monômero aumenta de forma constante com o tempo. Por exemplo, após 1,5 h a 4% de enzima a conversão é de 19% e atinge 74% após 9 h. As reações de polimerização são muito rápidas, em apenas 15 minutos, a uma temperatura de 60°C, ocorre uma conversão de 43% do monômero.

Na Figura 15, é possível visualizar o aumento de rendimento com o aumento da porcentagem de massa enzima com relação à massa de monômero. No tempo de 1,5 h, 3% de enzima obteve-se um rendimento de 8%. Com 5% de enzima, o rendimento passou para 21%, já para 15% de enzima, o rendimento foi de 50%. Com 12 h de reação, que é um tempo em que já está próximo de uma taxa de conversão igual a zero, com 3% de enzima, o rendimento alcançado foi de 65%, com 5% de enzima obteve-se uma conversão de 75% e com 15% de enzima, foram alcançados rendimentos de 85%.

Deng et. al. (1999) mostraram que a concentração de enzima usada em um sistema de polimerização tem um forte efeito na taxa de conversão de monômeros. Os rendimentos da conversão de caprolactona para um dado tempo são maiores para uma porcentagem de enzima maior. O aumento da conversão de monômero a temperatura de reação (65°C) em geral leva a maiores polímeros de massa molar. Na polimerização realizada a 65°C, a enantiosseletividade da enzima é afetada consideravelmente com o passar do tempo. Curiosamente, a enantiosseletividade da lipase, aumenta, com o aumento da temperatura até 65°C. Quanto maior a viscosidade da mistura da reação, maior o limite a acessibilidade dos monômero não reagido ao sítio ativo da lipase. A temperatura ideal de reação, por outro lado, se traduz numa maior fluidez na mistura de reação e, portanto, explica a conversão de 72%, 76% e 90% a 65°C, após 20 horas de reação (DENG et al., 1999).

De acordo com Gross et al. (2004), em solventes convencionais, há pouca variação na cinética de reação em função da temperatura, que variou de 35°C, 50°C e 65°C, embora a temperatura mais favorável foi relatado como sendo 65°C.

Segundo Vivas et al. (2003), com o aumento da temperatura da reação acima de 70°C, o massa molar e a produção de polímeros diminui progressivamente sugerindo a possível ocorrência de degradação térmica. O rendimento era de 95,18% a 60°C, a partir de 80°C decresce para 91,27%, a 100°C 87,55% e a 120°C 73,6%. Por isso, decidiu-se estudar a polimerização da caprolactona a 65°C.

Como observado na Figura 15, as taxas de conversão são maiores no início da reação. Após 12 horas, o rendimento aumenta 7% com 3% de enzima, 1% a 5% de enzima e 5% com 15% de enzima.

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi investigada a produção de poli(ϵ -caprolactona), polímero reconhecidamente biodegradável, em dióxido de carbono supercrítico catalisada por enzima, especificamente a lipase comercial Novozym 435. O efeito das variáveis que influenciam a reação de polimerização como: teor mássico de enzima em relação ao monômero, pressão e razão mássica solvente/substrato foi avaliado. Determinou-se a atividade enzimática da enzima comercial utilizada e a cinética da reação de polimerização em condições selecionadas.

Com base nos objetivos propostos, pode-se concluir que:

- A concentração de enzima é a variável mais significativa no processo, sendo que o rendimento aumenta à medida que aumenta a concentração de enzima;
- Os resultados de atividade enzimática residual variaram de 74% a 114%. Observa-se que não há perda que impossibilite, a princípio, a reutilização da enzima no processo de polimerização;
- A pressão, assim como a densidade do fluido solvente, não se mostrou uma variável significativa para a faixa estudada;
- A taxa de conversão é maior no início da reação.

6.1 Sugestões

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

- Emprego de outras enzimas;
- Emprego de outros fluidos pressurizados.

7 REFERÊNCIAS

- AGNELLI, J.A.M. Introdução a materiais poliméricos. Em: **Aperfeiçoamento em Tecnologia de Polímeros**, São Paulo /São Carlos. Curso.Ufscar/DEMA/NRPP, 282p, 2001.
- AKCELRUD, L. **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**. Ed. Manole, Barueri, São Paulo, 2007.
- AL-AZEMI, T. F, KONDAVETI, L, KIPAL, B. SC. Solventless Enantioselective Ring-Opening Polymerization of Substituted ϵ -Caprolactones by Enzymatic Catalysis, **Macromolecules** 2002, 35, 3380-3386
- ALBERTSSON, A. C.; SRIVASTAVA, R. K. **Recent developments in enzyme-catalyzed ring-opening polymerization**. *Advanced Drugs Delivery Reviews*, n. 60, p.1077-1093, 2008.
- ALVES, S. S. **Síntese de poli(ésteres-uretanos) à base de polióis de poli(hidroxitbutirato) e poli(caprolactona)**. 2008. 82p. Dissertação – Departamento de Físico-Química, Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo.
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS-ASTM. **Standard Test Methods for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting. ASTM D882-00**. In: ASTM Standards on Disc. Philadelphia, ASTM v.08.01. 9p., 2001
- AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS. **ASTM D 883: Terminology Relating to Plastics**. Annual Book of ASTM Standards, v. 08.01, 1992.
- ANDERSON, A. J.; DAWES, E. A.; Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. **Microbiol. Rev.**, v. 54, p. 450-472, 1990.
- ANDRADE, J. M. **Efeito de dióxido de carbono e propano pressurizados na atividade catalítica de D-Hidantoinase**. 2008. 85p. Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- BENDER, J. P.; FEITEN, M.; FRANCESCHI, E.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, J. V. Phase behavior of binary systems of lactones in carbon dioxide. **Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 42, p. 48-53, 2010.
- BERGEOT, V.; TASSAING T.; BESNARD M.; CANSELL F.; MINGOTAUD A. F. **Anionic ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone in supercritical carbon dioxide: parameters influencing the reactivity**. *Journal of Supercritical Fluids*, n.28, p.249-261, 2004.
- BILLMEYER, F.W. **Textbook of polymer Science**; John Wiley, Singapore, 1984.
- BORSCHIVER, S, ALMEIDA, L. F. M. E ROITMAN, T. Monitoramento Tecnológico e Mercadológico de Biopolímeros. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.18, n. 3, p. 256-261, 2008.

BRANDL, H.; GROSS, R. A.; LENZ, R. W.; FULLER, R. C. Plastics from bacteria and for bacteria: Poly(B-hydroxyalkanoates) as natural, biocompatible, and biodegradable polyesters, **Advanc. Biochem. Engineer. Biotechnol.**, v. 41, p. 77-93, 1990.

BUHLER, E, DOBRYNIN, A.V, deSIMONE, J.M, M. Rubinstein, **Macromolecules** 31 (1998) 7347.

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

CHANDRA, R.; RUSTGI, R. **Biodegradable Polymers**. Progr. Polym. Sci. v. 23, p. 1273-1335, 1998.

CASTRO, M. L. **Copolímeros estatísticos biodegradáveis de ϵ -caprolactona e I,l-dilactideo – Síntese, caracterização e propriedades**. 2006. 150p. Tese (Doutorado) – Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. São Paulo.

COOPER, A.I, MATER, J, **Chem.** 10 (2000) 207.

COOPER, A. I. Polymer synthesis and processing using supercritical carbon dioxide. **Journal of Materials Chemistry**, v. 10, p.207-234, 2000.

COPLEY, S. D. Enzymes with extra talents: Moonlighting functions and catalytic promiscuity. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 7, p.265, 2003.

CÓRDOVA, A, IVERSEN, T. **Lipase-Catalyzed Synthesis of Methyl 6-O-Poly(ϵ - caprolactone)glycopyranosides** **Macromolecules** 1998, 31, 1040-1045.

DARNEY, P. D.; KLAISLE C. M.; MONROE, S. E.; COOK, C. E. PHILLIPS, N. R.; SCHINDLER, A. Evaluation of a 1-year levonorgestrel-releasing contraceptive implant-side-effects, release rates and biodegradability. **Fertility and Sterility**, v.58, n.1, p137143, 1992.

DENG, R; CHEN, Y.; CHEN, P.; ZHANG, L.; LIAO, B. Properties and biodegradability of water-resistant soy protein/ poly (ϵ - caprolactone)/ toluene – 2,4 – diisocyanate composites. **Polymer Degradation and Stability**. Oxford, n.91, p.2189-2197, 2006.

DENG, F. GROSS, A. R. **Ring-opening bulk polymerization of ϵ -caprolactone and trimethylene carbonate catalyzed by lipase Novozym 435**. **International Journal of Biological Macromolecules** 25 (1999) 153–159.

DOTY, L. F. Uma breve visão geral sobre plásticos biodegradáveis. Trad. Michael Jack Ktisti. **Oxo-biodegradable Plastics Institute**, p. 1-11, 2005.

DUBOIS, P.; JEROME, R.; TEYSSIE, P. Macromolecular engineering of polylactones and polylactides. 3. Synthesis, characterization, and applications of poly(ϵ -caprolactone) macromonomers. **Macromolecules**, n.24, p.977-981, 1991.

den DUNNEN, W. F. A.; SCHAKENRAAD, J. M.; ZONDER-VAN, G. J.; PENNING, A. J.; VAN DER LEI, B.; ROBINSON, P. H. A new PLLA/PCL copolymer for nerve regeneration. **Journal of Materials Science Materials Medicine**, v.4, p.521-525, 1993

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

FALCONE D.M.B.; AGNELLI, J.A.M.; FARIA, L.I.L. de. Panorama setorial e perspectivas na área de polímeros biodegradáveis. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 17, n. 01, p. 5-9, 2007.

FARIA, A, U. **Biodegradação de Polipropileno (PP), de Polihidroxibutirato (PHB) e da Blenda PP/PHB(1:1) por Microorganismos de Rio Poluído e Efluente Bruto de Refinaria de Petróleo**. Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia Aplicada). 2009.

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

GONTARD, N. & GUILBERT, S. Bio-packaging: Technology and properties of edible and /or biodegradable material of agricultural origin. In: **Food packaging and preservation**. Mathouthi, M. ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow, p. 159-181, 1994.

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

GOMES, J. G. C.; BUENO NETTO, C. L. Produção de plásticos biodegradáveis por bactérias. **Ver. Bras. Eng. Quím.**, v. 17, p. 24-29, 1997.

GOMEZ, J. G. C.; RODRIGUES, M. F. A.; ALLI, R. C. P.; SILVA, L. F.; OLIVEIRA, M. S.; BUENO NETTO, C. L.; **Anais do 2o Congresso Brasileiro de Polímeros**, São Paulo, Brasil, 1993.

GUILBERT, S. Emballages consommables et biodégradables. In: **Conditionnement alimentaire: Innovation et Environnement**, ISECA (ed), p. 219-248, ISECA, Pouzauges, 1992.

GEUS, D, M, PEETERS, J, WOLFFS, M, HERMANS, T, PALMANS, A,R,A, KOING, C, E, HEISE,A. **Investigation of Factors Influencing the Chemoenzymatic Synthesis of Block Copolymers**. *Macromolecules* 2005, 38, 4220-4225

HAMMOND, D. A.; KAREL, M. E KLIBANOV, A. M. **Enzymatic reactions in supercritical gases**. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 11, p. 393, 1985.

HANS, M, GASTEIER, P, KEUL, H, MOELLER, M. **Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone by Means of Monoand Multifunctional Initiators: Comparison of Chemical and Enzymatic Catalysis**. *Macromolecules* 2006, 39, 3184-3193

HATTORI, K.; TOMITA, N.; YOSHIKAWA, T.; TAKAKURA, Y. Prospects for Bone fixation – development of new cerclage fixation techniques. **Materials Science & Engineering**, v.17, p.27-32, 2001.

JAHNO, V. D. **Síntese e caracterização do poli(l-ácido láctico) para uso como biomaterial**. 2005. 79p. Dissertação - Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e de Materiais, Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

JELLINEK, H. H. G.; KACHI, H.; **Degradation and stabilization of polymers**, v.2, Elsevier, USA, 1989.

JUAIS, D. Produção de **Polímeros Derivados de Fontes Renováveis via Catálise Enzimática**. 2009. 116p. Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Química. Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo.

KALOGIANNIS, C. G.; PANAYIOTOU, C. G. Bubble and cloud points of the system poly(ϵ -caprolactone) + carbon dioxide + dichloromethane or chloroform. **Journal of Chemical Engineering Data**, v.51, p.107–111, 2006.

KENDALL, J.L, CANELAS, D.A, Young, J.M. DeSimone, **Chem. Rev.** 99 (1999) 543.

KNEZ, Z.; HABULIN, M.; KRMELJ, V. **Enzyme catalyzed reactions in dense gases**. Journal of Supercritical Fluids, v.14, .17–29, 1998.

KIRBY, C.F, MCHUGH, M.A, **Chem. Rev.** 99 (1999) 565.

KIRAN, E, SARAF, Y.L, Sem, Int. J. **Thermophys.**10(1988) 437.

KRISTOFER, J, T, HEISE, A, GEUS D, M, VILLAROYA, S, ZHOU, J, WYATT, M,F, HOWDLE, S.M. **Kinetics of Enzymatic Ring-Opening Polymerization of ϵ -Caprolactone in Supercritical Carbon Dioxide**. Macromolecules 2006, 39, 7967-7972.

KRZAN, A.; HEMJINDA, S.; MIERTUS, S.; CORTI, A.; CHIELLINI,E. Standardization and certification in the area of environmentally degradable plastics. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, p. 2819-2833, 2006.

KTISTI, M. J. Uma breve visão geral sobre plásticos biodegradáveis. **OxoBiodegradable Plastics Institute**. Tradução do original em Inglês preparado por L. T. Doty, Ph.D – Oxo-biodegradable Plastics Institute, Canadá, janeiro 2005.

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

LI, S.; VERT, M. Biodegradation of aliphatic polyesters. In: GILEAD, D; SCOTT, G. **Degradable polymers-Principle & Applications**. London: Chapman & Hall, p. 43-87, 1995

LIN, Y. HSIEH, F., HUFF, H.E., AND IANNOTTI,E. Physical, mechanical and thermal properties of water-blown rigid polyurethane foam containing soy protein isolate. **Cereal Chemistry**, 73 (2), p. 189-196, 1996.

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

LOEKER, F. C.; Duxbury, C. J.; Kumar, R.; Gao, W.; Gross, R. A.;Howdle, S. M. **Macromolecules** 2004, 37, 2450-2453.

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

MARIANI, P.D.S.C.; NETO, A.P.V.; SILVA JR, J.P.; CARDOSO, E.J.B.N.;ESPOSITO, E.; MEI, L.H. I. Mineralization of Poli (ϵ -caprolactone) / Adipate Modified Starch Blend in Agricultural Soli. **Journal of Polymers and the Environment**, v. 15, n. 1, p. 19-24, jan. 2007.

MARIANI, P.D.S.C. **Estudo da biodegradação da blenda poli(ϵ -caprolactona) e amido de milho modificado em meios sólidos e líquidos**. 2005, 77p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Polímeros) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 2005.

MEI, Y.; Kumar, A.; Gross, R. A. **Macromolecules** 2002, 35, 5444-5448.

MESSIANO, A. J.; BECKMAN, E. J.; RUSSEL, A. J. **Supercritical Biocatalysis**. Chemical Reviews, v. 99, p. 623-633, 1999.

MEZZANOTE, V.; BERTANI, R.; INNOCENTI, D.; TOIN, M. Influence of inocula on the results of biodegradation tests. **Polymer Degradation and Stability**, v. 87, p.51-56, 2005.

MCHUGH, M. e KRUKONIS, V. **Supercritical Fluid Extration**, Stonenham, Butterworth-Heinenamm, 1994.

MINGOTAUD, A,-F, DARGELAS, CANCEL, F, **Macromol. Symp.**153 (2000) 77.

MINGOTAUD, A,-F, CANCEL, GILBERT,N, A. Soum, **Polym. J.**31 (5) (1999) 406.

NAKAMURA, K.; CHI, Y.M.; YAMADA, Y.; YANO, T. **Liase activity and stability in supercritical carbon dioxide**. Chemical Engineering Community, v. 45, p. 207, 1985.

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

OHTAKI, A.; SATO, N.; NAKASAKI, K. Biodegradatio of poly – ϵ – caprolactone under controlled composting conditions. **Polymer Degradation and Stability**, Oxford, v. 61, p.499-505, 1998.

PANTANO FILHO, R.; ROSA, D. S. **Meio Ambiente – Múltiplos Olhares**. Campinas/SP: Companhia da Escola, 2005. 277p.

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

RAPRA TECHNOLOGY LTD. **Biodegradable Polymers**. no. 19 Rapra Published Search Shawbury, Shrewsbury, Shorpsire. UK, 1989.

RÖPER, H. & KOCH, H. The role of starch in biodegradable thermoplastic materials, **Starch/Stärke**, Weinhein No 42(4) p. 123-130 1990.

ROSA, D. S.; CHUI, Q. S. H.; PANTANO FILHO, R.; AGNELLI, J.A.M. Avaliação da biodegradação de poli- β -(Hidroxibutirato), poli- β -(Hidroxibutirato-co-valerato) e poli- ϵ -(caprolactona) em solo compostado. **Polímeros**, v. 12, n. 4, p. 311-317, 2002.

RANDOLPH, T.W.; BLANCH, H.W.; PRAUSNITZ, J.M.; WILKE, C.R. **Enzymatic catalysis in a supercritical fluid**. Biotechnology Letters, v.7, p. 325-328, 1985.

SANTOS, D. R. **Produção enzimática de poli(ϵ -caprolactona) em dióxido de carbono supercrítico**. 2011. 65p. Dissertação - Curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

SARAF, V.P, KIRAN, E, **Polym. Prepr.** 31 (1990) 687.

SEBIO, L. D. Tese apresentada ao curso de Pós-graduação da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de **Doutor em Tecnologia de Alimentos**. 2003, Campinas, SP.

SIGMA-ALDRICH. Disponível em www.sigmaaldrich.com. Acesso: 12 de maio de 2011.

SILVA, E.R. **Biodegradação Fúngica de resíduos Agroindustriais para a Produção de Biomassa Microbiana, Enzimas Ligninocelulolíticas e Redução de Fitatos**. 2001. Tese de Doutorado em Ciências de Alimentos – Faculdade de Engenharia de Alimentos, UNICAMP, Campinas, 2001.

SLOMKOWSKI, S.; SOSNOWSKI, S.; GADZINOWSKI, M. Polyesters from lactides and ϵ -caprolactone. Dispersion polymerization versus polymerization in solution. **Polymer Degradation Stability**, v.59, p.153-160, 1998.

SRIDEWI, N.; BHUBADALAN, K.; SUDESH, K. Degradation of commercially important polyhydroxyalkanoates in tropical mangrove ecosystem. **Polymer Degradation and Stability**, v. 91, p. 2931-2940, 2006.

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

STEINBÜCHEL, A. Polyhydroxyalkanoic acids. 1991. In: DA SILVA, L. F. et al. *Produção Biotecnológica de Poli-hidroxialcanoatos para a Geração de Polímeros Biodegradáveis no Brasil*. **Quím. Nova**, São Paulo, v. XY, n.00, p. 1-12, 2007.

STEINBÜCHEL, A.; VALENTIN, H. E.; Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. **FEMS Microbiology Letters**, vol. 128, p. 219 – 228, 1995

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

SUDESH, K.; ABE, H. E.; DOI, Y.; Prog. Polym. Sci. 2000. In: Squio, C. R.; Aragão, G. M. F. Estratégias de Cultivo para Produção dos Plásticos Biodegradáveis Poli(3-hidroxibutirato) e Poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) por Bactérias. **Quim.Nova**. V. 27. n. 4. p. 615-622, 2004.

SWIFT, G. Opportunities for Environmentally Degradable Polymers. In: **Degradable polymers, recycling and plastics waste management**. Edited by Ann-Christine Albertsson and Samuel, J. Huang, New York: M. Dekker, p. 49-59, 1995.

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

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

TOKIWA, Y. Technical and miscellaneous degradable copolyesters. **Food, Cosmetics Drug Packaging**, v. 34, p. 11-12, 1989. AKCELRUD

A. L. **Fundamentos da Ciência dos Polímeros**. Barueri, SP: Manole, 2007.

VALETTE, P.; de CHOUDENS, Le bois la pâte, le papier. **Centre technique de l'industrie dès papiers**, Cartons et cellulose. Grenoble, 1989.

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

VERT, M. **Biodégradable: Réalités et Perspectives**. Caoutchoucs et Plastique, n. 706, p. 71-75, 1991.

VIVAS, M. CONTRERAS, J. **Ring-opening polymerization of ϵ -caprolactone initiated by diphenylzinc**. European Polymer Journal 39 (2003) 43–47, 2003.

VOLOVA, T. G.; GLADYSHEV, M. I.; TRUSOVA, M.Y.; ZHILA, N. O. Degradation of polyhydroxyalkanoates in eutrophic reservoir. **Polymer Degradation and Stability**, v. 92, n. 4, p. 580-586, 2007.

ZHOU, S, CHU, B, **Macromolecules** 31 (1998) 7746.

YUE, B; YANG, J.; WANG, Y.; HUANG, C.; DAVE, R.; PFEFFER, R. Particle encapsulation with polymers via in situ polymerization in supercritical CO₂. **Powder Technology**, v.146, p.32-45, 2004.