



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ANA DANIELLE DE QUEIROZ MELO**

**ESTUDO DA INTERAÇÃO DO POLIFOSFATO DE SÓDIO  
COM ÍONS METÁLICOS DIVALENTES E QUITOSANA COM  
APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE.**

**FORTALEZA**

**2018**

ANA DANIELLE DE QUEIROZ MELO

ESTUDO DA INTERAÇÃO DO POLIFOSFATO DE SÓDIO  
COM ÍONS METÁLICOS DIVALENTES E QUITOSANA COM  
APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE.

.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora. Área de Concentração: Química.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Audísio Dias Filho.

FORTALEZA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

M485e Melo, Ana Danielle de Queiroz.

Estudo da interação do polifosfato de sódio com íons metálicos divalentes e quitosana com aplicação em biocatálise. / Ana Danielle de Queiroz Melo. – 2018.

133 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Francisco Audísio Dias Filho.

1. polifosfato de sódio. 2. quitosana. 3. Imobilização. I. Título.

CDD 540

---

ANA DANIELLE DE QUEIROZ MELO

ESTUDO DA INTERAÇÃO DO POLIFOSFATO DE SÓDIO COM ÍONS METÁLICOS  
DIVALENTES E QUITOSANA COM APLICAÇÃO EM BIOCATÁLISE.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Química.  
Área de Concentração: Química Inorgânica

Aprovada em: 28/08/2017.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof. Dr. Francisco Audísio Dias Filho (Orientador)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Pablyana Leila Rodrigues da Cunha  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Aliny Abreu de Sousa Monteiro  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. José Cleiton Sousa dos Santos  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus.

Ao Professor Dr. Audísio Filho, pela orientação, parceria, confiança e ensinamentos acadêmicos compartilhados ao longo dos 8 anos de convívio profissional, desde os tempos de voluntariado, passando pela iniciação científica, mestrado até a finalização dessa última fase, o doutorado.

A banca pela disponibilidade e pelas considerações a cerca do trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará pela oportunidade de crescimento científico, assim como todo o Corpo Docente que compõem o Programa.

Aos Órgãos formentadores, CAPES, FUNCAP e CNPq pelo suporte financeiro concedido.

Aos laboratórios: Laboratório de Espectroscopia Raman do Departamento de Física da UFC e do laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Geologia da UFC, ao Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos do Departamento de Química da UFC pela disponibilidade de realização das técnicas de caracterização complementares a este trabalho.

Ao Instituto Federal do Sertão Pernambucano (IFsertão pernambucano) e ao Instituto Federal do Ceará (IFCE), instituições em que concomitantemente ao Doutorado eu lecionei e que por vezes, necessitei de atenção especial e sempre fui atendida a fim de cursar disciplinas, participar de reuniões periódicas de Grupo, realizar experimentos. Enfim, pelo consentimento na destinação de parte da minha carga horária docente para atividades referentes a minha qualificação profissional.

Aos amigos originalmente científicos – todos os discentes e docentes dos Laboratórios de Materiais Inorgânicos e de Bioinorgânica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica pelo acolhimento pessoal e pelo suporte laboratorial na

realização dos experimentos, em especial a Gilmara, Auridéia, Vivânia, Marquinhos, Amanda, Carlos e Ednaira.

Aos amigos originalmente pessoais – pessoas que tive a sorte de conhecer, conviver e que pela simples existência me ajudam a superar todas as dificuldades: Cristina, Manuela, Lourdes, Vanessa, Érika, Jaqueline, Luís Carlos, Gutto, Carlos Henrique, Alexandre Oliveira, Alexandre Carreira, Márcio, Edinir, Sr. Raimundo e Paula, Vladymir, Emly, Cleonice e Rivanda. Obrigada!

A minha família: minha amada mãe, Ivoneide de Queiroz (*in memoriam*), aos meus irmãos Nicolas e Alexandre, aos meus tios Ireuda, Iran, Dete, Cleide, Cléia (*in memoriam*), Ione e a minha avó, Francisca Queiroz por terem me acompanhado, incentivado e acima de tudo acreditado no meu potencial.

Ao meu esposo, Felipe Maia, pela parceria leal, produtiva e inspiradora dentro e fora do campo profissional, a amizade e o amor que nos une excede quaisquer condições otimizadas de energia e simetria.

Muito obrigada a todos!

“Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão”.

Max Planck

## RESUMO

A interação eletrostática existente entre as espécies, o polifosfato de sódio e os íons metálicos pode ser confirmada pela promoção do coacervato no meio reacional, tanto nos testes de coacervação simples (interação entre o polifosfato de sódio e um sal divalente), como nos testes de coacervação mista (interação entre o polifosfato de sódio e dois sais divalentes). Em ambos os casos foi observado uma dependência das propriedades dos coacervatos obtidos com a escolha do (s) sal (is) escolhido (s). As propriedades de raio iônico e entalpia de hidratação demonstraram ser essenciais ao entendimento da interação estabelecida entre o polifosfato de sódio e os cloretos de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , onde íons que formaram coacervatos naturalmente foram nomeados de íons formadores -  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$  - com valores de entalpia que revelam baixa interação deles com a água. Enquanto que os íons não formam coacervato naturalmente foram reunidos em outro grupo -  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ . Porém, quando adicionados na forma combinada íon formador – íon não formador houve a formação do coacervato para a maioria dos testes sem a necessidade de aditivos. As enzimas funcionam como biocatalisantes para inúmeras reações importantes; no entanto, sua aplicação apresenta limitações, o que pode ser superado usando estratégias apropriadas de imobilização. Nesse sentido, é proposto um novo suporte para imobilização de enzimas. Esse suporte orgânico-inorgânico híbrido é composto por quitosana, um biopolímero natural não tóxico, biodegradável e comestível, e o polifosfato de sódio, um componente inorgânico. A lipase *Candida antarctica* (CAL B) foi imobilizada em microesferas por encapsulação utilizando esses polímeros. A caracterização dos compósitos (por espectroscopia infravermelha, análise termogravimétrica e microscopia confocal Raman) confirmou a natureza híbrida do suporte, cuja parte externa consiste em polifosfato e núcleo composto de quitosana. A enzima imobilizada apresentou as seguintes vantagens: possibilidade de reutilização enzimática, recuperação fácil do biocatalisador, aumento da resistência às variações de temperatura (atividade diminuída de 60°C e enzima inativada a 80°C) e aumento da atividade catalítica nas reações de transesterificação. As enzimas



encapsuladas foram utilizadas como biocatalisantes para reações de transesterificação para produzir o composto responsável pelo aroma de jasmim.

**Palavras-chave:** Polifosfato. Quitosana. Imobilização.

## ABSTRACT

The electrostatic interaction between species, sodium polyphosphate and metal ions can be confirmed by the promotion of coacervate in the reactive environment, both in the simple coacervation tests (interaction between sodium polyphosphate and a divalent salt), as well as in the tests of mixed coacervation (interaction between sodium polyphosphate and two divalent salts). In both cases a dependence of the properties of the coacervates obtained with the choice of the salt(s) chosen was observed. The properties of ionic radius and enthalpy of hydration have been shown themselves to be essential to understand the interaction between sodium polyphosphate and the chlorides of  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ , where ions that formed coacervates were naturally named as forming ions -  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  - with enthalpy values that reveal low interaction with water, while the ions that do not form coacervate were assembled together into another group -  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$ . However, when added in the combined form (nonionic formator - ion formator), it happened the formation of coacervate for most of the tests without the need of additives. Enzymes serve as biocatalysts for many important reactions; however, their application has limitations, which could be overcome by using appropriate immobilization strategies. Here, a new support for immobilizing enzymes is proposed. This hybrid organic-inorganic support is composed of chitosan—a natural, nontoxic, biodegradable, and edible biopolymer—and sodium polyphosphate, the inorganic component. Lipase from *Candida Antarctica* (CAL B) was immobilized in microspheres by encapsulation using these polymers. The characterization of the composites (by infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, and confocal Raman microscopy) confirmed the hybrid nature of the support, whose external part consisted of polyphosphate and the core is composed of chitosan. The immobilized enzyme had the following advantages: possibility of enzyme reuse, easy biocatalyst recovery, increased resistance to variations in temperature (activity declined from 60°C and the enzyme was inactivated at 80°C), and increased catalytic activity in the transesterification reactions. The encapsulated

enzymes were used as biocatalysts for transesterification reactions to produce the compound responsible for the jasmine aroma.

**Keywords:** Polyphosphate. Chitosan. Immobilization.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	– Estrutura química do polifosfato de sódio.....	27
Figura 2	– Mecanismo de conversão de quitina à quitosana.....	30
Figura 3	– Mecanismo de protonação da quitosana.....	31
Figura 4	– Fluxograma da coacervação simples.....	40
Figura 5	– Fluxograma da coacervação mista.....	40
Figura 6	– Fluxograma da mistura polifosfato - quitosana.....	42
Figura 7	– Ordem de adição da albumina na eficiência da imobilização.....	43
Figura 8	– Imobilização da enzima lipase CAL B na microesfera de polifosfato- quitosana.....	44
Figura 9	– Metodologia para o teste da influência do tipo de solvente na imobilização da enzima lipase.....	45
Figura 10	– Metodologia para o teste da influência do tipo de solvente na imobilização da enzima lipase.....	46
Figura 11	– Espectro vibracional do polifosfato de sódio, na forma de pastilhas de KBr.....	53
Figura 12	– Espalhamento Raman do polifosfato de sódio.....	54
Figura 13	– Espectros vibracionais das quitosanas de procedência POLYMAR GD=92% (LOTE 1023) e GD=84% (LOTE 1029).....	55
Figura 14	– Espectros vibracionais das quitosanas com GD de 92% e Aldrich.....	57
Figura 15	– Espectro de RMN <sup>1</sup> H de quitosana 1023 a 70°C.....	58
Figura 16	– Espectro de RMN <sup>1</sup> H de quitosana sigma-aldrich a 70°C.....	59
Figura 17	– Curva GPC para a amostra de quitosana de procedência Polymar (LOTE 1023) .....	60

Figura 18 – Curva GPC para a amostra de quitosana de procedência Sigma-586 aldrich.....	60
Figura 19 – Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto, na forma de pastilhas de KBr.....	65
Figura 20 – Curvas reológicas <i>peak hold</i> de fluxo contínuo dos coacervatos simples a partir de sais de cloreto.....	66
Figura 21 – Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto do grupo do cálcio, na forma de pastilhas de KBr.....	72
Figura 22 – Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto do grupo do magnésio, na forma de pastilhas de KBr.....	73
Figura 23 – Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto do grupo do manganês, na forma de pastilhas de KBr.....	74
Figura 24 – Espalhamento RAMAN para os coacervato a partir dos sistemas CaCo.....	75
Figura 25 – Espalhamento RAMAN para os coacervato a partir do Grupo do magnésio.....	76
Figura 26 – Espalhamento RAMAN para os coacervato a partir do Grupo do manganês.....	76
Figura 27 – Curvas reológicas <i>peak hold</i> de fluxo contínuo dos coacervatos CaCo.....	78
Figura 28 – Curvas reológicas <i>peak hold</i> de fluxo contínuo dos coacervatos CaCu.....	78

Figura 29 – Curvas reológicas peak hold de fluxo contínuo dos coacervatos cloreto via coacervação mista MnZn.....	79
Figura 30 – Curvas reológicas peak hold de fluxo contínuo dos coacervatos cloreto via coacervação mista MgZn.....	80
Figura 31 – Espectros eletrônicos das soluções padrão de $\text{Cu}^{2+}$ .....	82
Figura 32 – Curva de calibração das soluções padrão de $\text{Cu}^{2+}$ .....	83
Figura 33 – Espectros eletrônicos dos sobrenadantes provenientes dos coacervatos mistos com $\text{Cu}^{2+}$ .....	84
Figura 34 – Espectros eletrônicos das soluções padrão de $\text{Co}^{2+}$ .....	85
Figura 35 – Curva de calibração das soluções padrão de $\text{Co}^{2+}$ .....	86
Figura 36 – Espectros eletrônicos dos sobrenadantes provenientes de coacervação mista com $\text{Co}^{2+}$ .....	87
Figura 37 – Fluxograma da incorporação do $\text{Co}^{2+}$ diretamente no coacervato a partir de $\text{NaPO}_3$ e $\text{CaCl}_2$ .....	89
Figura 38 – Esquema ilustrativo para teste visual de incorporação de $\text{Co}^{2+}$ no coacervato a partir de $\text{NaPO}_3$ e $\text{CaCl}_2$ .....	90
Figura 39 – Foto dos sobrenadantes (na parte inferior) e dos coacervatos (na parte superior) obtidos por coacervação mista com $\text{Ca}^{2+}$ e $\text{Co}^{2+}$ .....	90
Figura 40 – Foto representando em A (sequência poli-quit) o gel e B (sequência quit-poli) as microesferas.....	97
Figura 41 – Foto representando as microesferas no momento em que se formam à esquerda e após 10 minutos da separação com o sobrenadante, foto à direita.....	98
Figura 42 – Espectro Raman confocal das microesferas produzidas a partir de quitosana e polifosfato de sódio.....	99

Figura 43 – Figura ilustrativa que sugere a organização estrutural da microesfera.....	99
Figura 44 – Espectro vibracional dos precursores, polifosfato de sódio e quitosana e, das microesferas formadas a partir desses polímeros.	100
Figura 45 – TG dos precursores e da amostra de microesferas formada.....	101
Figura 46 – A - Metodologia adotada para a imobilização da enzima lipase e B foto das microesferas obtidas depois da imobilização.....	103
Figura 47 – Gráfico comparativo entre as atividades das enzimas livre e imobilizadas na microesfera.....	104
Figura 48 – Gráfico que relaciona a atividade com o tipo de solvente.....	105
Figura 49 – Gráfico que relaciona a atividade hidrolítica da enzima, nas formas livre e imobilizada, com o aumento da temperatura.....	106
Figura 50 – Tempo de meia vida da enzima imobilizada em suporte de quitosana polifosfato em diferentes valores de pH.....	107
Figura 51 – Esquema reacional da reação enantiosseletiva catalisada pela enzima lipase imobilizada pelo suporte de quitosana e polifosfato....	108
Figura 52 – Cromatograma CG-DIC do padrão (RS) - 1 - feniletanol.....	109
Figura 53 – Cromatograma CG-DIC da reação de acetilação do (RS) - 1 - feniletanol catalisada pela enzima imobilizada no suporte após 48h.	109
Figura 54 – Reação de síntese do aroma de jasmim catalisada pelas enzimas imobilizadas em suporte de quitosana-polifosfato.....	110
Figura 55 – Gráfico que relaciona o teor de conversão e o tempo de reação.....	111
Figura 56 – Cromatograma por CG-EM da reação de acetilação após 12 h catalisada pela enzima imobilizada.....	111
Figura 57 – Espectro de massa do álcool benzílico (A) e do acetato de benzila (B) .....	112

Figura 58 – Gráfico que relaciona o teor de conversão e os ciclos de reutilização.....	112
Figura 59 – Gráfico que relaciona o teor de conversão e o efeito do doador acila.....	
..	114
Figura 60 – Fotos de uma microesfera com lipase imobilizada, obtidas por um microscópio óptico com ampliação de 50x.....	115
Figura 61 – Micrografias da microesfera seca em A, a análise da composição por EDS em B. EM C a micrografia da microesfera imobilizada com lipase seca e em D a análise da composição por EDS.....	116
Figura 62 – Curvas termogravimétricas dos precursores e da amostra de microesferas formadas e das microesferas com a enzima lipase imobilizada.....	117



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Lista os reagentes utilizados e, as respectivas procedências.....	39
Tabela 2	– Composição das soluções salinas para o grupo do $\text{Ca}^{2+}$ .....	41
Tabela 3	– Sistemas utilizados para o teste de atividade hidrolítica.....	45
Tabela 4	– Estabilidade da enzima lipase imobilizada com a capacidade de reutilização.....	47
Tabela 5	– Utilização da enzima lipase imobilizada em uma reação de transesterificação.....	47
Tabela 6	– Utilização da enzima lipase imobilizada em uma reação de síntese do aroma artificial de jasmim.....	48
Tabela 7	– Principais modos vibracionais característicos do polifosfato de sódio.....	53
Tabela 8	– Propriedades da quitosana 1023 (polymar) e quitosana (Aldrich) .....	61
Tabela 9	– Resultados da influência do íon metálico na coacervação.....	63
Tabela 10	– Grandezas físico-químicas dos íons metálicos (OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2008) .....	64
Tabela 11	– Modos vibracionais, característicos do polifosfato, nos coacervatos e no polifosfato.....	65
Tabela 12	– Informações sobre os coacervatos mistos com $\text{Ca}^{2+}$ como íon formador.....	69
Tabela 13	– Informações sobre os coacervatos mistos com $\text{Mg}^{2+}$ como íon formador.....	70
Tabela 14	– Informações sobre os coacervatos mistos com $\text{Mn}^{2+}$ como íon formador.....	71
Tabela 15	– Resultados da quantificação do $\text{Cu}^{2+}$ nos diferentes coacervatos.....	84

Tabela 16 – Resultados da quantificação do $\text{Co}^{2+}$ nos diferentes coacervatos.....	88
Tabela 17 – Valores de GD teórico e real das amostras de quitosanas utilizadas	92
Tabela 18 – Valores de pH das soluções utilizadas na formação das esferas.....	94
Tabela 19 – Dados experimentais para os sistemas com razão molar polifosfato/quitosana igual a 1000:1.....	96
Tabela 20 – Dados experimentais para os sistemas com razão molar polifosfato/quitosana igual a 100:1.....	96
Tabela 21 – Resultados de absorvância para cada solvente testado.....	105

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	22
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....	26
2.1	Polifosfato de sódio .....	26
2.2	Quitossana .....	29
2.3	Coacervação .....	31
2.3.1	<i>Coacervação simples e mista</i> .....	33
2.3.2	<i>Coacervação complexa</i> .....	34
2.3.3	<i>Imobilização de enzimas</i> .....	35
3	OBJETIVOS .....	38
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL .....	39
4.1	Coacervação simples e mista .....	39
4.2	Interação polifosfato-quitossana .....	41
4.3	Imobilização de proteínas e enzimas .....	42
4.3.1	<i>Atividade hidrolítica</i> .....	44
4.3.2	<i>Estabilidade da enzima lipase imobilizada com o tipo de solvente</i> ..	45
4.3.3	<i>Estabilidade da enzima lipase imobilizada com a variação da temperatura</i> .....	46
4.3.4	<i>Estabilidade da enzima lipase imobilizada no suporte em diferentes pHs</i> .....	46
4.3.5	<i>Capacidade de reutilização da enzima lipase imobilizada</i> .....	46
4.3.6	<i>Biocatálise em reações orgânicas – reação de transesterificação</i> ..	47
4.3.7	<i>Biocatálise em reações orgânicas – reação de síntese do aroma artificial de jasmim</i> .....	48
4.4	Equipamentos e técnicas experimentais .....	48
4.4.1	<i>Espectroscopia RAMAN</i> .....	48
4.4.2	<i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho</i> .....	49
4.4.3	<i>Espectroscopia Eletrônica na região do UV-Vis</i> .....	49
4.4.4	<i>Análise Reológica</i> .....	49
4.4.5	<i>Análise Termogravimétrica</i> .....	49
4.4.6	<i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i> .....	50

<b>4.4.7</b>	<b><i>Cromatografia Gasosa acoplado a Espectroscopia de massa (CG-EM)</i></b> .....	50
<b>4.4.8</b>	<b><i>Cromatografia Gasosa acoplado a detector de ionização em chama (CG-DIC)</i></b> .....	50
<b>4.4.9</b>	<b><i>Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (RMN <sup>1</sup>H)</i></b> .....	51
<b>4.4.10</b>	<b><i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i></b> .....	51
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	52
<b>5.1</b>	<b>Caracterização dos precursores</b> .....	52
<b>5.1.1</b>	<b><i>Polifosfato de sódio</i></b> .....	52
<b>5.1.1.1</b>	<b><i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho</i></b> .....	52
<b>5.1.1.2</b>	<b><i>Espectroscopia RAMAN</i></b> .....	53
<b>5.1.2</b>	<b><i>Quitosana</i></b> .....	54
<b>5.1.2.1</b>	<b><i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho</i></b> .....	55
<b>5.1.2.2</b>	<b><i>Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H)</i></b> .....	57
<b>5.1.2.3</b>	<b><i>Cromatografia de Permeação em gel (GPC)</i></b> .....	59
	<b>CAPÍTULO 1 COACERVAÇÃO SIMPLES E MISTA</b> .....	62
<b>5.2</b>	<b>Coacervação simples</b> .....	63
<b>5.2.1</b>	<b><i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho</i></b> .....	64
<b>5.2.2</b>	<b><i>Análise Reológica</i></b> .....	66
<b>5.3</b>	<b>Coacervação mista</b> .....	68
<b>5.3.1</b>	<b><i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho</i></b> .....	71
<b>5.3.2</b>	<b><i>Espectroscopia RAMAN</i></b> .....	74
<b>5.3.3</b>	<b><i>Análise Reológica</i></b> .....	77
<b>5.3.4</b>	<b><i>Espectroscopia Eletrônica na região do UV-Vis</i></b> .....	80
<b>5.3.4.1</b>	<b><i>Cobre</i></b> .....	82
<b>5.3.4.2</b>	<b><i>Cobalto</i></b> .....	85
	<b>CAPÍTULO 2 INTERAÇÃO POLIFOSFATO DE SÓDIO E QUITOSANA</b> .....	91
<b>5.4</b>	<b>Interação polifosfato-quitosana</b> .....	92
<b>5.4.1</b>	<b><i>Concentração do ácido acético na etapa de solubilização</i></b> .....	93
<b>5.4.2</b>	<b><i>Razão molar NaPO<sub>3</sub>/Quitosana</i></b> .....	94
<b>5.4.3</b>	<b><i>Ordem de adição dos reagentes</i></b> .....	97

<b>5.4.4</b>	<b><i>RAMAN confocal</i></b> .....	98
<b>5.4.5</b>	<b><i>Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho</i></b> .....	99
<b>5.4.6.</b>	<b><i>Análise Termogravimétrica</i></b> .....	100
<b>5.5</b>	<b>Aplicação das microesferas – Imobilização de proteínas e enzimas</b>	101
<b>5.5.1</b>	<b><i>Atividade hidrolítica</i></b> .....	103
<b>5.5.2</b>	<b><i>Estabilidade da enzima lipase imobilizada com o tipo de solvente</i></b> .	104
<b>5.5.3</b>	<b><i>Estabilidade da enzima lipase imobilizada com a variação da temperatura</i></b> .....	106
<b>5.5.4</b>	<b><i>Estabilidade da enzima lipase imobilizada no suporte em diferentes pHs</i></b> .....	107
<b>5.5.5</b>	<b><i>Catálise em reações orgânicas</i></b> .....	108
<b>5.5.5.1</b>	<b><i>Reação de transesterificação</i></b> .....	108
<b>5.5.5.2</b>	<b><i>Síntese enzimática do aroma de jasmim</i></b> .....	109
<b>5.5.5.3</b>	<b><i>Avaliação do efeito do doador acila na síntese do acetato de benzila</i></b> ....	113
<b>5.5.6</b>	<b><i>Caracterização das microesferas imobilizadas com lipase</i></b> .....	115
<b>5.5.6.1</b>	<b><i>Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)</i></b> .....	115
<b>5.5.6.2</b>	<b><i>Análise Termogravimétrica</i></b> .....	116
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	118
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	119

## 1 INTRODUÇÃO

Interações eletrostáticas originam produtos que podem indicar se as partículas dispersas têm uma afinidade fraca (liofóbica) ou forte (liofílica) com o meio dispersante. Diferentemente de outros agregados liofóbicos o coacervato, objeto de estudo no trabalho, apresenta a capacidade de reter água em grandes quantidades, conferindo então a substância baixa tensão interfacial e auxiliando no equilíbrio entre as fases geradas pela conhecida reação de coacervação (QIN, 2014). Existem basicamente dois tipos de coacervação: a simples e a complexa, sendo a primeira uma mistura de um poliíon e um sal divalente, a mistura de um poliíon e de sais divalentes distintos também geram um coacervato (nesse caso, oriundo de uma coacervação mista) e a segunda a mistura entre dois poliíons de cargas opostas, dentre os produtos passíveis de serem gerados no meio se destacam o coacervato e microesferas.

As aplicações dos coacervatos compreendem inúmeros campos de atuação, contudo a mistura de soluções de poliíons proporciona a formação de um novo produto diferente dos coacervatos, as vesículas ou microesferas que representam um veículo promissor para a indústria farmacêutica, na liberação de fármacos. A formação de microesferas, a partir de dois polieletrólitos de cargas opostas, no caso o polifosfato de sódio e a quitosana, um material híbrido orgânico-inorgânico, deve-se a ordem de adição dos reagentes.

O uso de enzimas como catalisadores industriais e na síntese orgânica é frequentemente conveniente porque as enzimas são muito específicas, seletivas e capazes de exibir uma atividade muito alta em comparação com os catalisadores convencionais (JESIONOWSKI *et al.*, 2010). No entanto, o uso de enzimas para biocatálise industrial apresenta algumas desvantagens, tais como: custo elevado de produção, uma vez que são sintetizadas em pequenas concentrações pelas células com extração e purificação caras, estabilidade moderada em condições operacionais, baixa atividade versus substratos não fisiológicos, especificidade ou seletividade absoluta em substratos relevantes industrialmente, etc. Algumas dessas desvantagens podem ser superadas pelo desenvolvimento de técnicas de imobilização enzimática capazes de manter (ou até mesmo aumentar) a atividade

enzimática, modular a seletividade ou a especificidade da enzima, melhorar a resistência aos inibidores (MATEO *et al.*, 2007; GARCIA-GARLAN *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2013) e ainda aumentar a pureza da enzima (BARBOSA *et al.*, 2015). Além dessas características é desejável que a técnica de imobilização permita a fácil recuperação do catalisador a partir do meio de reação através da filtração, após o uso reduzindo assim os custos operacionais globais (SHELDON, 2013; DICOSIMO *et al.*, 2013; LIESE, 2013).

O mercado mundial de enzimas industriais é dominado por produtos que contêm enzimas não imobilizadas. Isso é justificado por problemas levantados pelo custo dos suportes utilizados para a imobilização e pelo custo do processo de imobilização das enzimas. Além disso, uma imobilização enzimática não adequada pode piorar o desempenho da enzima (DICOSIMO *et al.*, 2013).

Entre as enzimas, o uso de lipases como biocatalisantes vem ganhando destaque nos últimos anos pela utilização em diferentes tipos de solventes (líquidos iônicos, fluidos supercríticos, solventes orgânicos e meios aquosos menos contaminantes), com diferentes substratos e podendo catalisar uma ampla gama de reações (MANOEL *et al.*, 2015; VILLALBA *et al.*, 2016; BEZERRA *et al.*, 2017). O uso de lipases como catalisadores resulta em síntese seletiva, com baixa ou nenhuma produção de subprodutos indesejáveis e sendo ambientalmente segura (KUO *et al.*, 2014). Assim, as lipases são uma classe importante de enzimas em meios biológicos (CUI *et al.*, 2012; CUI *et al.*, 2016), sendo os biocatalisadores mais utilizados, com aplicação em processos de esterificação, transesterificação e hidrólise para uma variedade de compostos químicos (ZDARTA *et al.*, 2017). Em outras palavras, nas sínteses orgânicas, as lipases ocupam uma posição central (GUTERMAN *et al.*, 2006).

O número de técnicas de imobilização que visam melhorar a estabilidade, atividade, seletividade e especificidade das lipases, bem como sua resistência a inibidores ou desnaturantes tem aumentado (DE SOUZA *et al.*, 2016; BONAZZA *et al.*, 2017; RUEDA *et al.*, 2016). Existem muitas técnicas para imobilização enzimática, a maioria delas possui vantagens e desvantagens (ZHANG *et al.*, 2013). Existem dois grandes tipos de abordagens para a imobilização enzimática, ou seja, irreversíveis e reversíveis. Os métodos irreversíveis mais comuns são a ligação covalente (YUCE-

DURSON *et al.*, 2016) o aprisionamento em suportes (BRADY, 2009), a reticulação das enzimas anteriormente adsorvidas fisicamente nos suportes e na microencapsulação. O método reversível mais comum de imobilização é a adsorção física (ANDERSON *et al.*, 1998).

A imobilização é, em muitos casos, associada a uma diminuição da atividade enzimática produzida por ligeiras distorções na estrutura das enzimas ou limitações difusórias, embora em alguns casos um aumento na atividade enzimática seja alcançado (ZDARTA *et al.*, 2017). Uma maior atividade de uma determinada enzima imobilizada pode ser derivada de uma diminuição da inibição ou distorção da enzima e não é necessária a partir da produção de uma conformação mais ativa da enzima (FERNÁNDEZ-LAFUENTE, 2009). A prevenção da dissociação enzimática nas enzimas multiméricas pode ser outra forma de melhorar a atividade ou estabilidade da enzima, principalmente quando utilizada em condições de dissociação (ANDERSON *et al.*, 1998). A atividade de uma enzima depende da sua estrutura tridimensional e o passo de imobilização pode levar a rearranjos conformacionais alterados, com efeitos positivos ou negativos na atividade enzimática (LIESE, 2013).

Uma das técnicas preferidas para imobilização enzimática é a imobilização em suportes pré-existentes (ZHANG *et al.*, 2013). No entanto, a produção de suporte sólido *exnovo* também pode ser de grande interesse. Esses suportes sólidos *exnovo* podem ser sintetizados a partir de uma mistura de polímeros com cargas iônicas opostas que maximizam a estabilidade enzimática e física, de uma enzima. Os polissacarídeos aniônicos, como o alginato [26-28], formam coacervatos mantidos através de fortes interações ou microesferas com cátions (por exemplo,  $\text{Ca}^{2+}$ ) ou polissacarídeos catiônicos, tais como quitosana (HUO *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2015). Essas estratégias de imobilização podem ser quase ideais para estabilizar enzimas multiméricas porque a dissociação enzimática será evitada (ANDERSON *et al.*, 1998).

A quitosana é um polímero natural, que é produzido a partir de quitina (SHUKLA *et al.*, 2013). A quitina é normalmente isolada dos exoesqueletos de muitas espécies de insetos e crustáceos (CANELLA, 2001). Além disso, a quitosana é um composto catiônico formador de gel biocompatível que pode ser prontamente preparado em



diferentes configurações geométricas, tais como membranas, grânulos, nanopartículas por nano-imobilização [34], fibras, fibras ocas ou esponjas (CHEN *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2015; RAMIREZ *et al.*, 2016).

O polifosfato de sódio é um eletrólito inorgânico, polimérico e poli-aniônico com alta capacidade de sequestro de cátions (KOPP *et al.*, 2012). Inicialmente, foi denominado hexametáfosfato de sódio e, posteriormente, a nomenclatura foi modificada porque o método amplamente utilizado para a produção deste sal polimérico produz uma mistura de polímeros lineares com diferentes comprimentos. O polifosfato de sódio ainda se destaca como o único fosfato solúvel em água, constituído por grupos aniônicos distribuídos em toda a cadeia polimérica, os cátions podem interagir com sua cadeia aniônica (WANG *et al.*, 2016). As microesferas formadas por polifosfato de sódio e quitosana foram utilizadas para imobilizar a enzima lipase (KRAKOWIAK *et al.*, 2003).

Esses dois polímeros são atóxicos e biodegradáveis, a quitosana, por exemplo, costuma ser utilizada como suporte para a imobilização da lipase (GUPTA *et al.*, 2013; DOS SANTOS *et al.*, 2017; MALMIRI *et al.*, 2012), o uso do polifosfato de sódio para tal finalidade se restringe a de um modificador químico (GUPTA *et al.*, 2006). Além disso, a quitosana já é utilizada em inúmeras aplicações, com a aprovação de agências reguladoras nacionais e internacionais, como meio de imobilizar drogas, na preparação de filmes protetores para alimentação, no tratamento de água entre outras aplicações (SHAHIDI *et al.*, 1999).

Rattanaphra e Srinophakun usaram quitosana como suporte para imobilizar lipase em reações de transesterificação de óleo de girassol e *Jatropha* com metanol, constatando que a transformação do óleo de girassol foi catalisada com sucesso (RATTANAPHRA *et al.*, 2010). Embora seja possível a síntese desse éster por métodos químicos convencionais, tais métodos de produção apresentam inúmeras desvantagens, tais como alta temperatura, toxicidade dos reagentes, uso de catalisadores corrosivos e baixa seletividade e, assim, aumentam a possibilidade de geração de subprodutos, ao mesmo tempo que essas substâncias indesejadas podem comprometer a pureza ou impedir a purificação do produto alvo (ZHU *et al.*, 2011).

A interação entre os grupos catiônicos de quitosana e uma monocamada de fosfolípido foi utilizada para produzir um suporte de imobilização por Krajewska (KRAJEWSKA *et al.*, 2013). Neste artigo, a síntese de uma monocamada de fosfolípido seguindo a técnica de filme de Langmuir e um estudo da sensibilidade da camada para a temperatura e os valores de pH, demonstrou que não apenas uma interação eletrostática estava envolvida na formação da monocamada, havia também contribuições não-eletrostáticas significativas para a síntese.

Os ésteres são produtos químicos de grande importância econômica nas indústrias alimentar, farmacêutica e cosmética (BERGER, 2009). Entre os ésteres de ácidos carboxílicos de cadeia curta, o acetato de benzilo é de grande interesse, com aplicações em diferentes campos. A produção anual deste composto alcança 10 mil toneladas. Esse éster pode ser obtido a partir de fontes naturais, uma vez que está presente em plantas, como jasmin e gardenia; no entanto, a extração e purificação direta são altamente complexas e caras (GARLAPATI *et al.*, 2013).

A motivação dessa pesquisa foi analisar os efeitos do encapsulamento de enzima em um novo suporte constituído a partir de quitosana e polifosfato de sódio. Como enzima modelo, foi escolhida a lipase *Candida antarctica* (CAL B), por ser uma das enzimas mais estudadas na literatura (GROIBOLLOT *et al.*, 1993; PIACENTINI *et al.*, 2017; MONDAL *et al.*, 2015; DOS SANTOS *et al.*, 2015). Após o processo de imobilização foi efetuado a caracterização do suporte por técnicas espectroscópicas e o estudo da estabilidade e atividade desse biocatalisador no suporte proposto, avaliando sua termoestabilidade, o efeito do solvente e sua enantiosseletividade.

Em seguida a enzima imobilizada e caracterizada no suporte de quitosana-polifosfato foi avaliada quanto sua capacidade de síntese de um éster de interesse industrial, o acetato de benzila, que se constitui como um aroma artificial de jasmin. A síntese foi realizada através de uma reação de transesterificação a partir do álcool benzílico e do acetato de vinila.

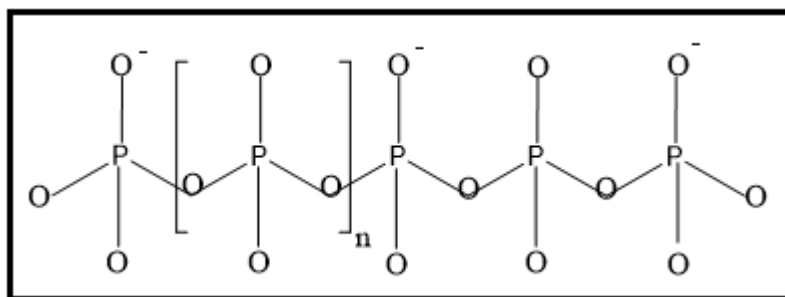
## **2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

### **2.1 Polifosfato de sódio**

Os sais de fosfato são sintetizados a partir de fostatos condensados com comprimentos de cadeia variável, onde reações de hidrólise podem ser desencadeadas por alterações no pH, temperatura e força iônica que devem ser evitadas pois cadeias menores de fosfatos não apresentam propriedades sequestrantes de cátions (RULLIERE *et al.*, 2012). Os polifosfatos, também chamados de fosfatos condensados, são oligopolímeros inorgânicos, que em meio aquoso se comportam como polieletrólitos (HOLLAND, 2014). O polifosfato de sódio foi inicialmente nomeado como hexametáfosfato e mais tarde sua compreensão foi modificada para uma mistura de polímeros lineares (MOMENI, 2014).

O polifosfato ainda se destaca por ser o único fosfato solúvel em água e um excelente sequestrador de cátions por interação eletrostática em virtude de apresentar cargas negativas distribuídas por toda a cadeia polimérica, conforme mostrado na figura 1. Por ser inerte, o polifosfato de sódio é considerado um biopolímero, onde cátions interagem com a cadeia aniônica do polifosfato de sódio através de uma interação competitiva, cátions com raios iônicos próximo apresentam comportamento análogos (WANG *et al.*, 2016).

Figura 1. Estrutura química do polifosfato de sódio, onde n representa o grau de polimerização.



Fonte: Próprio Autor.

O grau de polimerização, ou seja, o comprimento médio da cadeia é importante por influenciar no número de cargas elétricas existentes. O polifosfato de sódio, comercialmente conhecido como Sal de Graham pode ser considerado um polifosfato condensado de massa molar intermediária e ligado mais comumente ao metal alcalino sódio (PICKUP *et al.*, 2014). O grau de polimerização, n, pode apresentar valores entre 2 e 106 (KULAKOVSKAYA, *et al.*, 2011).

Os polifosfatos são divididos entre: fosfatos condensados cíclicos, lineares e ultra fosfatos (elevado grau de condensação) e podem ser obtidos a partir de reações de condensação, a elevadas temperaturas, em que fosfatos tetraédricos são condensados por eliminação de água. Na formação de um polímero essas reações são denominadas de policondensação (CINI, 2014).

As principais características que determinam a aplicação comercial do polifosfato são: i) baixo custo, ii) ser um composto inorgânico fosforado condensado; iii) ser carregado negativamente possibilitando assim a formação de complexos com cátions de metais diferentes, iv) se ligar e reter quantidades consideráveis de água devido à formação de ligação de hidrogênio e v) ser atóxico e biodegradável (KULAKOVSKAYA, *et al.*, 2011).

As aplicações do polifosfato são fortemente dependentes do grau de polimerização o que implica no tipo de síntese utilizado e das propriedades físico-químicas do polifosfato, tais como: densidade de carga e estabilidade estrutural. Polifosfatos também são usados em produtos característicos da agroindústria, tais como: fertilizantes; amaciantes de carnes, peixes e produtos lácteos; misturas para melhorar a textura e a estabilidade de produtos da carne, estabilizante de alimentos para aumentar a vida de prateleira e como antioxidante. A habilidade sequestrante de cátions da cadeia aniônica do polifosfato de sódio também é explorada na tecnologia da fabricação do queijo, pois ao interagir com o íon cálcio, importante ingrediente do queijo processado, acarreta a dispersão e a hidratação da proteína, produzindo assim uma emulsão de queijo fundido homogêneo (RULLIERE *et al.*, 2012).

Adicionalmente, o polifosfato de sódio se caracteriza por ser um polímero constituído por inúmeras cadeias de monômeros de fosfato, facilmente encontrados em tecidos de plantas e animais. Esses fosfatos apresentam forte relevância biológica e química. A forte interação entre cátions divalentes e a cadeia aniônica de polifosfato abrange a possibilidade do sequestro de cátions tratados como espécies tóxicas, como:  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  bem como outros (CINI, 2014).

Devido à interação eletrostática, polímeros lineares de cargas opostas em solução aquosa são capazes de formar coacervatos e/ou microesferas com polímeros orgânicos e inorgânicos a partir da eletroneutralidade. Como espécies catiônicas

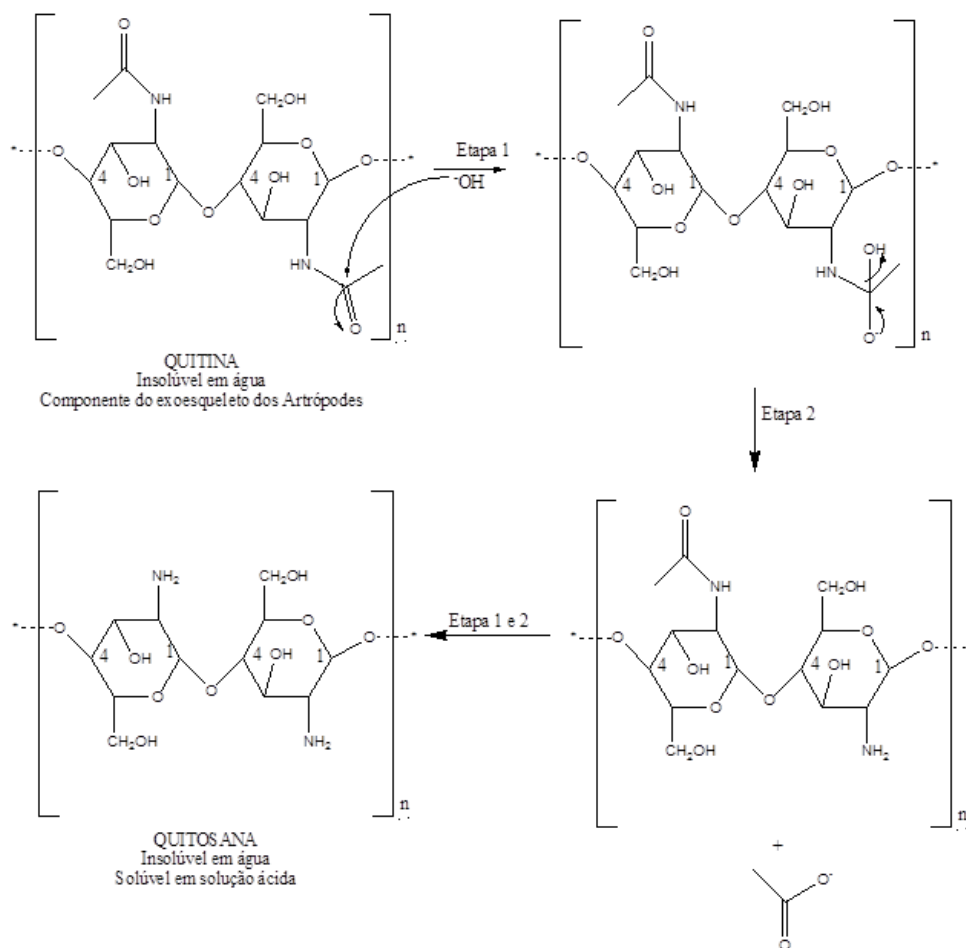
possíveis de serem utilizadas se destacam: os metais divalentes, as proteínas, os ácidos nucléicos, políons catiônicos dentre outros.

## **2.2 Quitosana**

A quitosana é um polímero biodegradável, atóxico e derivado de produtos naturais renováveis, por exemplo, dos exoesqueletos de insetos e crustáceos na forma de outro polímero natural – a quitina. A quitosana é constituída por unidades repetidas de glucosaminas, que pode ser obtida pela desacetilação da quitina.

Estruturalmente a quitosana e a quitina se diferenciam pela seguinte composição: 2-acetamido-2-deoxi-D-glicopiranosose (constituente majoritário da quitina) e 2-amino-2-deoxi-D-glicopiranosose (constituente majoritário da quitosana) unidas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4). Sendo assim, a conversão de quitina para quitosana ocorre através de uma reação de desacetilação pela hidrólise dos grupos acetamida da quitina em meio alcalino conforme demonstrado pelo mecanismo ilustrado na figura 2.

Figura 2. Mecanismo de conversão de quitina à quitosana.



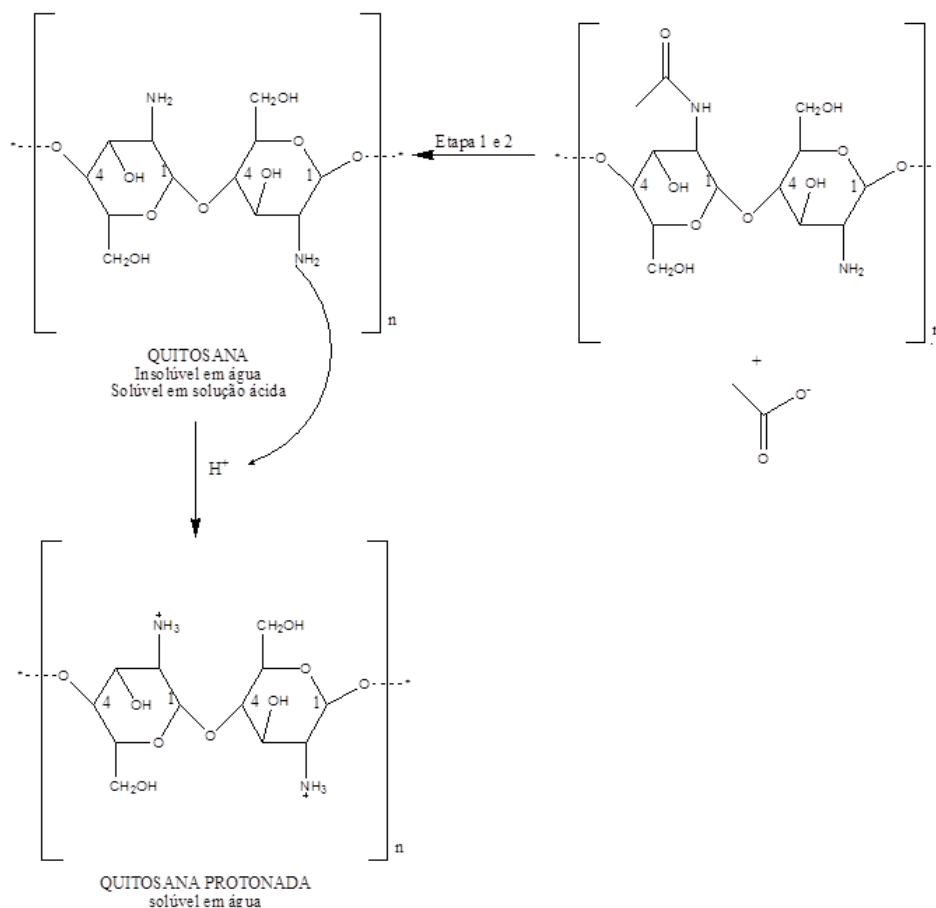
Fonte: Próprio Autor.

Devido à presença de grupos amina na estrutura química da quitosana e, conseqüentemente, a possibilidade de sítios ativos positivos serem gerados ao longo da cadeia a quitosana interage eletrostaticamente com ânions, sejam esses monômeros ou polímeros. Por outro lado, por ser uma base fraca, possui efeito quelante para alguns íons metálicos. Comercialmente, a quitosana pode ser encontrada na forma de flocos, pó fino e solução, com massa molar média variando entre 3.800 a 2.000.000 g/mol e grau de desacetilação entre 66 a 95%.

A quitosana é uma base fraca, insolúvel em água e em solventes orgânicos, porém é solúvel em soluções ácidas ( $\text{pH} < 6,5$ ) que por sua vez converte as unidades de

glucosamina em unidades de  $R-NH_3^+$ , conforme mostra o mecanismo ilustrado na figura 3.

Figura 3. Mecanismo de protonação da quitosana.



Fonte: Próprio Autor.

### 2.3 Coacervação

Coacervato é uma palavra oriunda do latim cujo significado é *co* (união) e *acerv* (agregação). O químico holandês Bungenberg de Jong foi o pioneiro a propor o termo coacervato para a comunidade científica em setembro de 1929 (MENGER *et al.*, 1998). A coacervação é uma separação de duas macrofases líquida-líquida coexistindo em equilíbrio que pode ser entendida como um resultado de um pareamento entre cargas opostas. A referidas fases se diferenciam entre si pela viscosidade e concentração em colóides. A fase mais rica em colóide, e que apresenta maior viscosidade, é chamada coacervato e a fase com menor viscosidade e,

consequentemente, pobre em colóide, é chamada de líquido de equilíbrio ou sobrenadante (DE OLIVEIRA *et al.*, 2005).

A coacervação pode ser de dois tipos: a) coacervação simples ou separação de fase agregativa - onde ocorre uma separação de fases oriunda da interação entre soluções de um polieletrólito e sais multivalentes (individualmente ou combinados) e, b) coacervação complexa ou separação de fase associativa - onde ocorre uma separação de fase oriunda da interação entre duas soluções de polieletrólitos de cargas opostas onde as soluções de partida mais comuns são: proteínas, polímeros, micelas, dendrímeros dentre outros (KIZILAY *et al.*, 2011).

Na síntese de coacervatos comumente estão envolvidas as seguintes variáveis reacionais: a densidade do polieletrólito, a força iônica, o grau de polimerização, o pH, a massa molar, a temperatura e a estequiometria. A obtenção do coacervato pode ser entendida como sendo uma consequência da neutralização das cargas dos polímeros precursores, ou seja, por uma condensação das cadeias cuja neutralização entre as cargas favorece a coacervação. A atração eletrostática só ocorre por apresentar uma entropia favorável (KIZILAY *et al.*, 2011).

Os coacervatos obtidos a partir da interação entre o polifosfato de sódio e íons metálicos em solução aquosa apresentam um comportamento interessante quando submetidos a altas temperaturas. Ao sofrerem tratamento térmico os coacervatos demonstram como única perda de massa a saída da água aprisionada no sistema, o que justifica o coacervato ser apontado como um precursor vítreo já que não se observa perda de massa decorrente de um processo de degradação da cadeia polimérica (WILLOT *et al.*, 2002).

Dentre as aplicações possíveis dos coacervatos, tem-se: um grande potencial para substituição óssea, incorporação de compostos orgânicos, candidatos como sistemas de entrega de drogas, aplicações biomédicas, dispositivos ópticos e absorção de íons de metais pesados (FRANCO *et al.*, 2016).

A investigação sobre os mecanismos que regem a coacervação simples e a complexa é uma área de pesquisa importante e ativa, mas ainda há dúvidas a respeito do entendimento da interação. Especificamente para a coacervação simples alguns



questionamentos merecem destaque. Por que somente alguns íons metálicos, de mesma carga, formam coacervatos? Que fatores, além do caráter essencialmente eletrostático, influenciam no fenômeno? Entender como a interação ocorre e os parâmetros que devem ser considerados ajudará na previsão e proposta de novos sistemas.

### 2.3.1 Coacervação simples e mista

A interação do polifosfato de sódio com íons metálicos promove a formação de coacervatos com características viscoelásticas, natureza polimérica e de alta viscosidade. A coacervação simples pode ser iniciada espontaneamente ou pela adição de solventes menos polares, como os álcoois etílico e metílico em uma razão volumétrica mínima de 10% do volume do sistema. Os álcoois agem como indutores da coacervação. Vale ressaltar que a coacervação ocorre pela troca do sódio por outro (s) cátion (s) tais como:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  ou outros íons metálicos de maior valência (FRANCO *et al.*, 2016).

Coacervatos produzidos a partir de polifosfatos apresentam como uma das características a degradação, em ambiente aquoso e a temperatura ambiente, num ritmo rápido, perdendo assim cerca da metade da massa original em uma semana e transformando-se principalmente em pirofosfato após 4 semanas, ou seja, ocorre o cisalhamento da cadeia (MOMENI, 2016).

Íons  $\text{M}^{2+}$  com raios iônicos elevados (por exemplo  $\text{Sr}^{2+}$  e  $\text{Ba}^{2+}$ ) induzem a floculação enquanto os íons metálicos divalentes de raios menores (por exemplo,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Ca}^{2+}$ ) induzem a coacervação. Alterações na natureza do cátion divalente, como raio iônico e entalpia de hidratação, assim como o tamanho médio da cadeia de polifosfato de sódio influenciam as propriedades físicas desses materiais como, por exemplo, a reologia (MOMENI, 2016).

A interação da cadeia aniônica de polifosfato com dois ou mais íons  $\text{M}^{2+}$  pode ser chamada de coacervação mista, uma nomenclatura nova, proposta pelos autores do presente trabalho a fim de avaliar a viabilidade de diferentes cátions serem atraídos pela cadeia ao mesmo tempo – o que poderia ajudar na elucidação do mecanismo de coacervação.

### 2.3.2 Coacervação complexa

Para fazer uma distinção entre os coacervatos obtidos por coacervação simples costuma-se usar o termo complexo de polieletrólitos (*polyelectrolyte complex-PEC*), para descrever o produto oriundo da coacervação complexa. A literatura reporta três tipos de complexos envolvendo polieletrólitos que podem ser formados simultaneamente: a) solúvel; b) coloidal; c) coacervato. Os três produtos se diferenciam primordialmente pela solubilidade e viscosidade, onde somente os produtos do tipo coloidal e coacervato se separam em uma nova fase no sistema, espontaneamente. Vale ressaltar que a principal característica da formação do complexo polieletrólito é que em ambas as fases existe uma equivalência na quantidade dos políons precursores. Porém, a estequiometria dessa reação depende de alguns fatores: a) flexibilidade/rigidez da cadeia polimérica, uma vez que na interação eletrostática ocorre um enovelamento das cadeias de cargas opostas, assim como da distribuição das cargas ao longo da cadeia. Resultados sugerem que uma distribuição desigual das cargas favorece um complexo polieletrólito não estequiométrico; b) sítios carregados no meio da cadeia ou nas ramificações do polímero já que podem dificultar a interação entre os polímeros de cargas opostas (VANEREK, 2005).

O complexo polieletrólito do tipo solúvel em água pode ser preferencialmente formado quando: a) houver uma diferença significativa na massa molar dos polieletrólitos de cargas opostas, b) existir um excesso de cadeias longas de um polieletrólito, e c) a razão molar entre políons for muito próxima. O complexo solúvel em água consiste na mistura de políons em que um dos componentes apresenta cadeia longa e o outro de cadeia curta, de cargas opostas que ligam de forma uniforme (OGAWA, 2015).

Na coacervação complexa, os parâmetros reacionais mais importantes são: a) a força iônica (concentração de sais), b) a natureza dos políons, incluindo o

tamanho da cadeia e a densidade c) o pH, d) a concentração molar dos políons precursores e e) temperatura reacional (PRIFTIS *et al.*, 2013).

A coacervação complexa encontra aplicação na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica devido ao caráter encapsulador dos polieletrólitos (BOSNEA *et al.*, 2014) além da preparação de micelas, vesículas, hidrogéis e como embalagens para enzimas e outros papéis biológicos (PRIFTIS *et al.*, 2013). Considera-se como uma grande vantagem dos coacervatos obtidos por coacervação complexa a microencapsulação que viabiliza a liberação controlada de substâncias aromáticas, nutrientes, medicamentos, catalisadores dentre outros (PANDYA, 1991).

### **2.3.3 Imobilização de enzimas**

As enzimas são catalisadores biológicos (ou biocatalisadores) que são extensivamente usados na síntese de inúmeras moléculas com propriedades biológicas e aplicações industriais (HUNG *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2015). Esses biocatalisadores possuem a vantagem de serem quimiosseletivos, minimizando a geração de subprodutos nos processos químicos. São regioseletivos, ou seja, capazes de diferenciar grupos funcionais idênticos situados em regiões diferentes da molécula, habilidade não encontrada nos catalisadores químicos convencionais (BLOISIA *et al.*, 2016).

Outra propriedade importante é a enantiosseletividade, ou seja, são capazes de diferenciar um par de enantiômero, proporcionando com isso, síntese com elevada pureza óptica, característica que é crucial no desenvolvimento de fármacos, que possuem em grande parte moléculas opticamente ativas. Destacam-se, também, por atuarem em condições brandas de reação (temperatura ambiente e pressão atmosférica), são totalmente biodegradáveis e de fonte renovável, por exemplo: plantas, microorganismos e animais (BORNSCHEUER, 2002; JU *et al.*, 2011).

Apesar da importância há uma desvantagem no emprego de enzimas como biocatalisadores. O elevado custo de obtenção já que são produzidas em pequenas concentrações pelas células e necessitam de etapas dispendiosas para extração e purificação. Essa dificuldade tem sido contornada pelo desenvolvimento de suportes

que permitam a imobilização das enzimas assegurando que a atividade catalítica seja mantida, a recuperação do meio reacional de forma simples (filtração) além de viabilizar seu uso em vários ciclos, reduzindo o custo de operação (GRIEBENOW, *et al.*, 1999; LOZANO, *et al.*, 2014; MANOELA *et al.*, 2014,2015).

Proteínas e enzimas se caracterizam por serem instáveis, hidrofílicas, apresentar baixa estabilidade (destruídas nas aplicações), apresentar elevada massa molar, possuir estrutura química complexa e apresentar baixa permeabilidade que contribuem como fatores limitantes na utilização. Além disso, geralmente apresentam tempo de meia-vida curto, devido à degradação enzimática natural. Para contornar esses problemas a literatura reporta algumas estratégias que propiciam condições mais favoráveis para o emprego das enzimas e proteínas.

Os tipos de imobilização mais comuns são os métodos irreversíveis (por ligação covalente, aprisionamento, microencapsulação e *cross linking*) e os métodos ditos reversíveis (adsorção, por ligação iônica, quelação, por ligações dissulfeto e ligações por afinidade). Já os suportes mais utilizados para a imobilização são classificados em dois tipos: orgânicos (polímeros naturais: polissacarídeos, proteínas e cadeias carbônicas e, os polímeros sintéticos: poliestireno e outros polímeros) e inorgânicos (minerais naturais e materiais processados como o vidro) (BRENA, 2006).

A preparação de microesferas a partir de quitosana está difundido na literatura (KUMAR *et al.*, 2004; DE QUEIROZ *et al.*, 2006; WEN *et al.*, 2012) apresenta mecanismos de formação variados, cada um deles apresenta vantagens e desvantagens com inúmeras aplicações associadas. Porém uma das metodologias mais usuais é a formação de microesferas a partir de interação eletrostática entre a quitosana e políons aniônicos.

A mistura de polieletrólitos (PEs) com cargas opostas a fim de obter microesferas ou microcápsulas ocas representa um método conveniente e versátil pois apresenta vantagens interessantes: a) possibilidade de encapsulação de fármacos, b) regulação da cinética de liberação de moléculas hospédes (fármacos e proteínas, por exemplo) pelo controle do pH e c) controle de tamanho e espessura das microesferas - no geral, o tamanho varia entre 0,1 a 10  $\mu\text{m}$  e, a espessura varia entre 10 a 100 nm (MU *et al.*, 2011).

Biopolímeros como a quitosana e o alginato de sódio, por exemplo, têm comprovado a eficiência para produzir suportes para a encapsulação de substâncias farmacêuticas ativas e enzimas (DELBAERE, *et al.*, 2016). Microesferas de quitosana se destacam por serem biodegradáveis e atóxicas além de proporcionar um sistema de distribuição homogêneo. Essas propriedades têm atraído atenção para potenciais aplicações no processamento de alimentos, engenharia biomédica, indústria farmacêutica, dentre outros (HUO *et al.*, 2016).

A imobilização de enzimas em transportadores/suportes insolúveis é uma técnica muito disseminada e que viabiliza a aplicação das enzimas em diferentes meios. Porém a diminuição da atividade enzimática em um meio orgânico, por exemplo, é uma limitação conhecida e se deve a um problema na transferência de memória, o que pode ser solucionado através de técnicas de imobilização das enzimas. O suporte enzimático proposto nesse trabalho a partir de quitosana e polifosfato de sódio é um veículo sólido, atóxico, resistente a variações de pH e temperatura o que torna a enzima imobilizada insensível a fatores que favoreçam a instabilidade, além de ser inédito na literatura.

As microesferas formadas a partir de quitosana são bem conhecidas, porém as metodologias adotadas até então não produziam as microesferas a partir desses dois polieletrólitos – quitosana e polifosfato. Por exemplo, a metodologia adotada por Krakowiak *et al.* (2003), produziu microesferas por precipitação e não, por coacervação complexa, nessa metodologia ainda houve a adição de polifosfato que atuou como um modificador para neutralizar a carga residual extra das microesferas já formadas (TRZCINSKA *et al.*, 2007) enquanto que, no presente estudo a formação das microesferas se deveu somente a interação eletrostática entre os dois políons, quitosana e polifosfato.

Neste sentido a imobilização da enzima hidrolítica Lipase CAL B em microesferas formadas pela interação entre quitosana e polifosfato pode evidenciar um novo suporte a ser utilizado para imobilização de enzimas. Esses polímeros apresentam a vantagem de serem totalmente biodegradáveis e atóxicos, possuindo aplicações inclusive na indústria de alimentos e bebidas, o que torna o catalisador imobilizado neste sistema ainda mais atrativo do ponto de vista industrial.

### 3 OBJETIVOS

Este trabalho tem como **objetivo geral**:

Estudar a interação do polifosfato de sódio com íons metálicos divalentes e com um polieletrólito (quitosana) para fins de aplicação em catálise de reações orgânicas.

Como **objetivos específicos**, têm-se:

#### **Interação polifosfato com íons metálicos**

- Preparar coacervatos a partir dos seguintes cloretos metálicos: Ca, Mg, Mn, Co, Zn e Cu;
- Estudar a influência da entalpia de hidratação ( $\Delta H_{\text{hidr}}$ ), raio iônico e razão carga/raio dos íons metálicos na formação dos coacervatos;
- Caracterizar os coacervatos por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis, espectroscopia vibracional na região do infravermelho, por análise reológica e por espectroscopia RAMAN.

#### **Interação polifosfato com quitosana**

- Estudar a melhor composição reacional para a interação do polifosfato com a quitosana considerando os seguintes parâmetros experimentais: razão molar polifosfato/quitosana, grau de desacetilação da quitosana, concentração de ácido acético usado na solubilização da quitosana e ordem de adição dos reagentes;
- Caracterizar os sistemas por espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis, espectroscopia RAMAN confocal, cromatografia de permeação em gel (GPC), Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN), microscopia eletrônica de varredura (MEV), análise termogravimétrica (TG), espectroscopia vibracional na região do infravermelho, cromatografia gasosa acoplado à espectroscopia de massa e cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama.
- Avaliar o produto formado da interação do polifosfato com quitosana como potencial suporte para encapsulação da enzima lipase CAL B.

## 4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

### Lista de reagentes

A tabela 1 lista os reagentes utilizados e, as respectivas procedências.

Tabela 1. Lista os reagentes utilizados e, as respectivas procedências

Reagente	Procedência
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	VETEC
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	VETEC
MnCl <sub>2</sub> .H <sub>2</sub> O	VETEC
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	VETEC
ZnCl <sub>2</sub> anidro	VETEC
CuCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	VETEC
(NaPO <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>	MERCK
Quitosana GD(%)= 84 e 92	POLYMAR
Quitosana GD(%)= 75-85	SIGMA ALDRICH
Ácido acético glacial PA	SYNTH
Álcool etílico P.A.	SYNTH
Albumina	REAGEN
Lipase CAL B	NOVOZYME

\*GD= Grau de desacetilação

Fonte: Dados da pesquisa

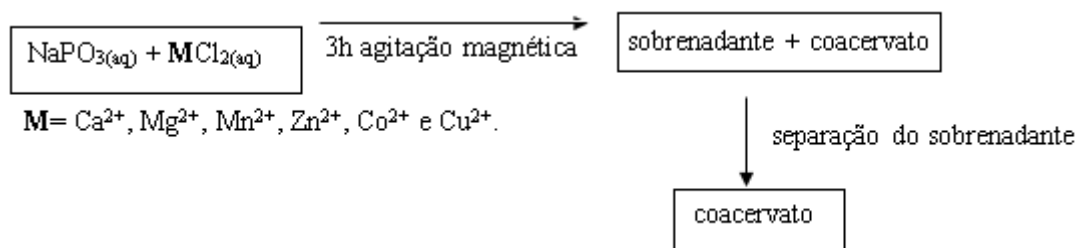
### 4.1 Coacervação simples e mista

Foram avaliados a espontaneidade de coacervação de sais de cloretos dos seguintes íons divalentes Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, onde íons que formaram coacervatos naturalmente foram nomeados de íons formadores - Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> e Mn<sup>2+</sup>- com valores de entalpia que revelam baixa interação deles com a água. Sendo assim, esses íons foram reunidos em grupos com os íons que não formam coacervato naturalmente - Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>- na forma combinada os íons formadores promoveram a interação da cadeia aniônica e os íons não formadores a fim de formar os coacervatos sem a adição de aditivos.

Todos os coacervatos foram obtidos numa razão de  $\text{NaPO}_3/\text{MCl}_2$  igual a 2:1 com a solução aquosa de polifosfato de sódio ( $\text{NaPO}_3$ )  $4 \text{ mol.L}^{-1}$  (10 mL) e a solução aquosa de sal divalente (cloretos de:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ )  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  (10 mL).

A metodologia usada para a preparação dos coacervatos está ilustrada na figura 4.

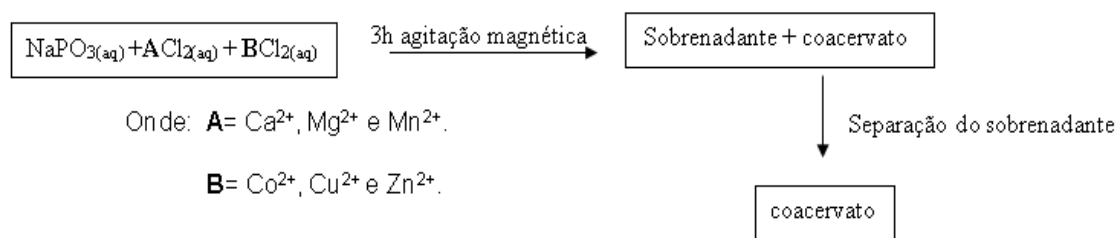
Figura 4. Fluxograma da coacervação simples



Fonte: Próprio Autor.

Avaliou-se também a formação de coacervatos pela adição de uma solução com dois íons metálicos diferentes. A esse processo deu-se o nome de coacervação mista. Os coacervatos obtidos via coacervação mista foram divididos em 3 grupos. A composição dos grupos foi de acordo com os íons metálicos que formam naturalmente coacervato (especificamente,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ ), combinados individualmente com os outros íons metálicos analisados em que a adição de álcool etílico demonstrou ser uma exigência para a formação do coacervato (especificamente,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ). A metodologia usada na coacervação mista está ilustrada na figura 5.

Figura 5. Fluxograma da coacervação mista



Fonte: Próprio Autor.

Todos os coacervatos foram obtidos numa razão de  $\text{NaPO}_3/\text{A}_a\text{B}_b\text{Cl}_2$  igual a 2:1, onde  $a + b = 1$  e A= íon formador e B= íon não formador. As soluções usadas foram



de polifosfato de sódio ( $\text{NaPO}_3$ )  $4 \text{ mol.L}^{-1}$  (10 mL) e soluções aquosas dos sais divalentes (cloretos de:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ )  $2 \text{ mol.L}^{-1}$  conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Composição das soluções salinas para o grupo do  $\text{Ca}^{2+}$

Íons	$V_{\text{ion formador}} (\text{Ca}^{2+})$ mL	$V_B$ (mL)	Nomenclatura no trabalho
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	2,5	7,5	CaCo2,5
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	5,0	5,0	CaCo5,0
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Co}^{2+}$	7,5	2,5	CaCo7,5
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$	2,5	7,5	CaCu2,5
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$	5,0	5,0	CaCu5,0
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Cu}^{2+}$	7,5	2,5	CaCu7,5
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$	2,5	7,5	CaZn2,5
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$	5,0	5,0	CaZn5,0
$\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Zn}^{2+}$	7,5	2,5	CaZn7,5

B =  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$

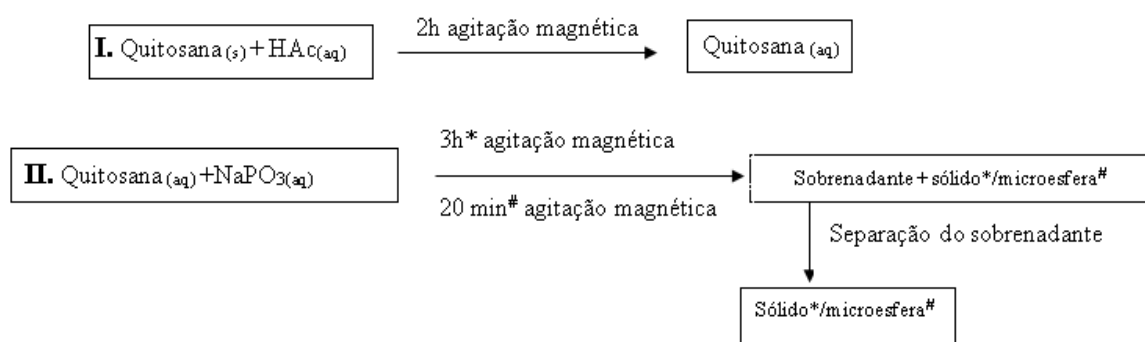
Fonte: Dados da pesquisa.

A mesma metodologia adotada para o grupo de cálcio foi utilizada para os grupos de magnésio e manganês, totalizando um número de 72 coacervatos divididos em 3 grupos.

#### 4.2 Interação polifosfato-quitosana

Inicialmente, a quitosana foi solubilizada em ácido acético (HAc), pH em torno de 3,0. Em seguida, misturou-se a solução de quitosana com a solução aquosa de polifosfato de sódio. Foi proposto duas ordens de mistura dos reagentes conforme mostrado no esquema da figura 6.

Figura 6. Fluxograma da mistura polifosfato - quitosana



Fonte: Próprio Autor.

Algumas variáveis reacionais foram avaliadas e são descritas abaixo:

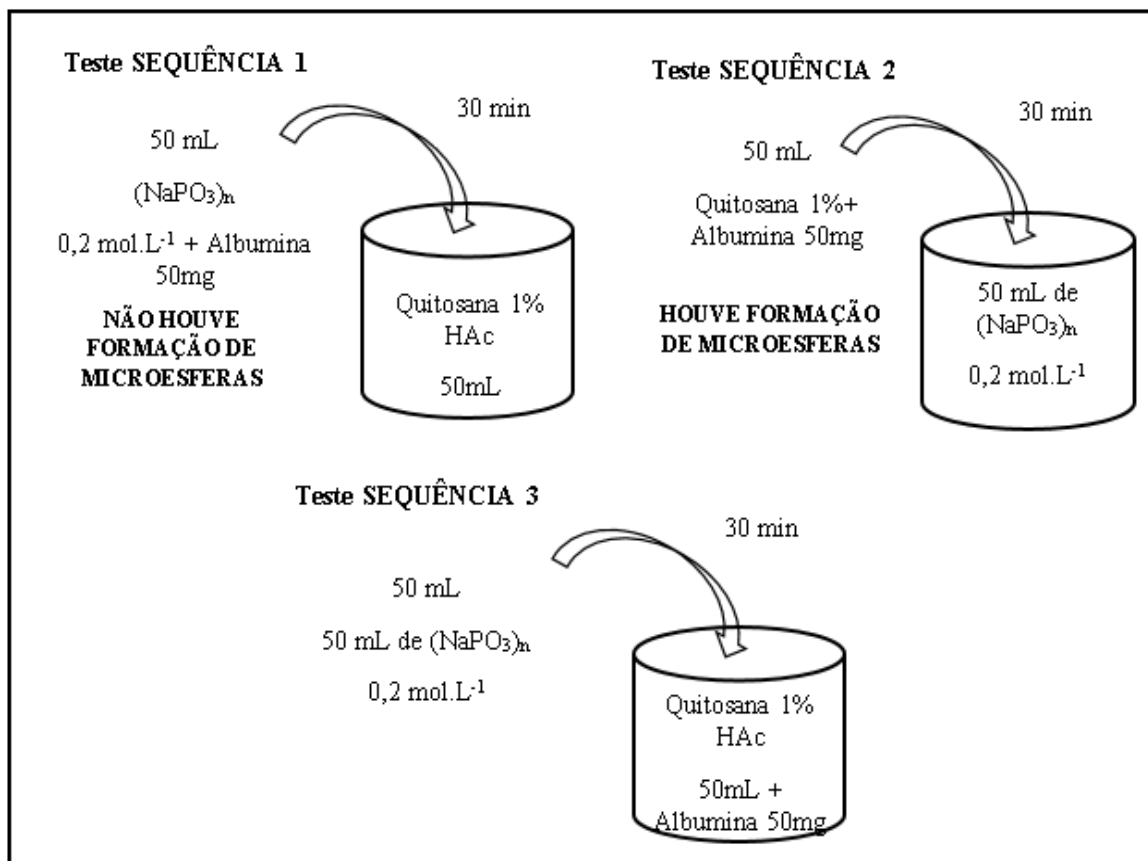
- Grau de desacetilação da quitosana: Foram usadas duas amostras de procedência polymar com 84% e 92% de grau de desacetilação.
- Concentração do ácido acético: avaliou-se três concentrações diferentes de ácido acético para solubilização da quitosana 1, 5 e 10%, v:v em água destilada. A quitosana foi dissolvida em 100mL da solução do ácido sob agitação magnética, sendo a concentração final da quitosana 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>;
- Razão molar NaPO<sub>3</sub>/Quitosana: Foram testadas razões molares NaPO<sub>3</sub>/Quitosana de 1000 e 100 pela mistura de 5 mL de quitosana 1023/1029 misturadas com 5 mL de solução aquosa de polifosfato 0,2 e 0,02 mol.L<sup>-1</sup>, respectivamente;
- Ordem de adição dos reagentes: Avaliou-se a mistura dos reagentes em duas situações, a primeira a solução de quitosana foi adicionada, gota a gota, à solução de polifosfato de sódio e a segunda a solução de polifosfato foi adicionada, gota a gota, à solução de quitosana à solução de polifosfato, o sistema permaneceu sob agitação magnética por 20 minutos e para, o sistema em que o polifosfato de sódio foi adicionado à solução de quitosana, o tempo de agitação magnética foi de 3 horas.

### 4.3 Imobilização de proteínas e enzimas

Inicialmente o suporte constituído de quitosana e polifosfato foi utilizado para a imobilização de proteína, no caso a albumina bovina. Foram testadas 3 rotas

representadas por seqüências de adição da proteína ao sistema, demonstradas na figura 7.

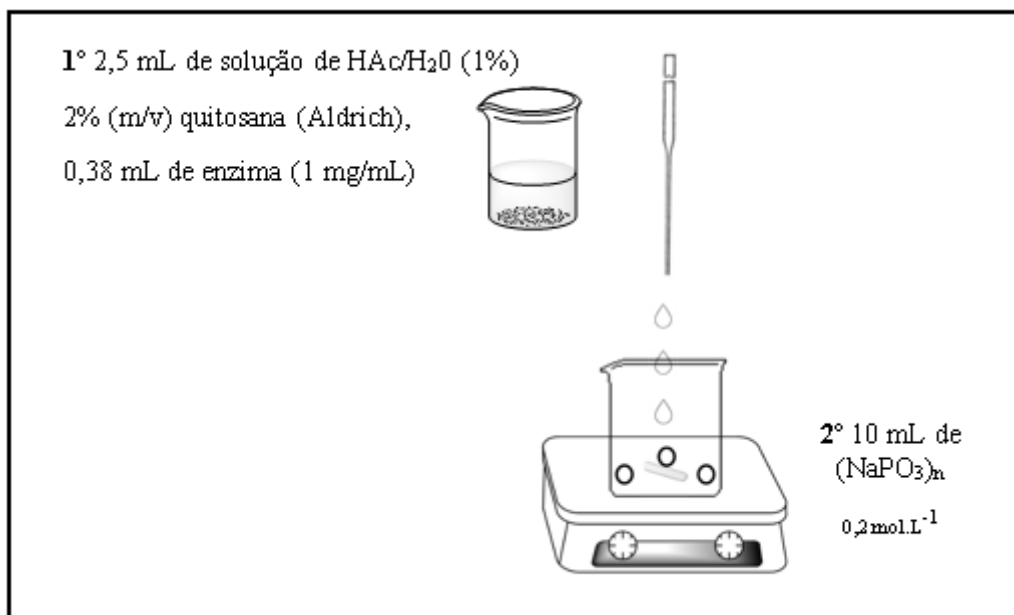
Figura 7. Ordem de adição da albumina na eficiência da imobilização



Fonte: Próprio Autor.

Após a otimização da imobilização de proteína através da seqüência de adição dos reagentes, foi testada a imobilização da enzima Lipase CAL B nas microesferas. A imobilização, por encapsulação, seguiu a metodologia mostrada na figura 8. Inicialmente foi misturado uma solução de quitosana e da enzima, mantida sob agitação magnética por 30 minutos e após esse tempo a solução foi adicionada, gota a gota, a uma solução de polifosfato de sódio sob agitação por 10 minutos contados ao final da adição.

Figura 8. Imobilização da enzima lipase CAL B na microesfera de polifosfato-  
quitosana



Fonte: Próprio Autor.

#### 4.3.1 Atividade hidrolítica

A avaliação da atividade hidrolítica baseou-se em metodologia já descrita na literatura (Silva, et al, 2017), onde 300µL de acetato de *p*-nitrofenila (PNPA), 20mmol, em acetona, foi adicionado a 3mL de solução tampão pH 7,0 (0,5 mol.L<sup>-1</sup>). Em seguida 5mg da enzima imobilizada foi adicionado ao sistema que ficou sob agitação por 10 min. Em seguida a solução foi filtrada e o teor de PNP liberado foi quantificado em espectrofotômetro a 410nm. Uma unidade de atividade hidrolítica (U) foi definida como a capacidade de liberar 1µmol de PNPA por minuto por mg de catalisador (µmol.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup>).

A metodologia está detalhada na tabela 3, com a inclusão do reuso das enzimas após lavagem em triplicata com solução tampão fosfato pH 7,0, representado pela nomenclatura REP (uma abreviação que significa repetição).

Tabela 3. Sistemas utilizados para o teste de atividade hidrolítica

<b>SISTEMAS</b>		
<b>10 mg enzima imobilizada</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL PNPA/Acetona 20mmol.L <sup>-1</sup>
<b>REP 10 mg enzima imobilizada</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL PNPA/Acetona 20mmol.L <sup>-1</sup>
<b>10 mg enzima imobilizada</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL Acetona
<b>46 µL de enzima lipase livre</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL PNPA/Acetona 20mmol.L <sup>-1</sup>
<b>Branco/Controle</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL PNPA/Acetona 20mmol.L <sup>-1</sup>

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.3.2 Estabilidade da enzima lipase imobilizada com o tipo de solvente

A metodologia adotada (Wilson 2004) está descrita na figura 9, o sistema foi mantido sob agitação magnética por 10 minutos e após esse período o sobrenadante foi analisado. Os solventes orgânicos utilizados foram: Acetonitrila 25% (ACN 25%), Acetonitrila 40% (ACN 40%), tetrahydrofurano (THF 60%) e dimetilsulfóxido 20% (DMSO 20%). Em todos os casos a proporção foi SOLVENTE/Tampão fosfato pH 7,0, v:v.

Figura 9. Metodologia para o teste da influência do tipo de solvente na imobilização da enzima lipase

<p>3000 µL + 300 µL de PNPA 20mmol.L<sup>-1</sup> (acetona) + 5mg enzimas imobilizadas (em torno de 3 microesferas secas)</p> <p><b>SOLVENTE</b></p>
--

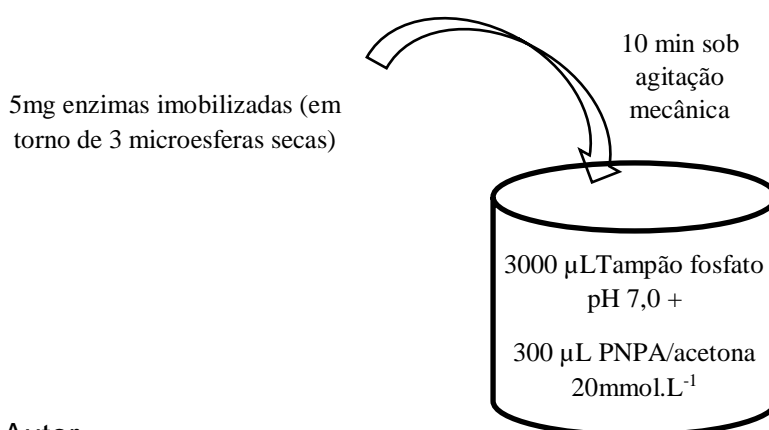
Onde PNPA = Paranitro fenil acetato

Fonte: Próprio Autor.

#### 4.3.3 Estabilidade da enzima lipase imobilizada com a variação da temperatura

Um dos fatores cruciais no estudo de atividade enzimática é a temperatura, o suporte proposto com a enzima lipase imobilizada e da enzima livre foram testados nas temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80°C, de acordo com a metodologia adaptada de Freire (2015) e descrita na figura 10. As microesferas só foram adicionadas a cada sistema testado a medida que a temperatura de análise foi atingida.

Figura 10. Metodologia para o teste da influência do tipo de solvente na imobilização da enzima lipase



Fonte: Próprio Autor.

#### 4.3.4 Estabilidade da enzima imobilizada no suporte em diferentes pHs

A análise da estabilidade da enzima livre e imobilizada no suporte enzimático em diferentes valores de pH ocorreu a uma temperatura de 65°C. Os valores avaliados foram pH 4,0 utilizando o tampão de biftalato de potássio, pH 7,0 utilizando o tampão fosfato e pH 9,6 utilizando o tampão carbonato/bicarbonato de sódio com metodologia adaptada de Bolívar (2009).

#### 4.3.5 Capacidade de reutilização da enzima lipase imobilizada

O teste de reuso do biocatalisador com a enzima imobilizada, somente é possível quando a imobilização enzimática é estável o suficiente para garantir a repetição na utilização, o que viabiliza avaliar a eficiência da técnica de imobilização. A composição dos sistemas estudados está descrita na tabela 4.

Tabela 4. Estabilidade da enzima lipase imobilizada com a capacidade de reutilização

<b>SISTEMAS</b>		
<b>Branco/Controle</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL PNPA/Acetona 20mmol.L <sup>-1</sup>
<b>5 mg enzima imobilizada</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL PNPA/Acetona 20mmol.L <sup>-1</sup>
<b>REP 5 mg enzima imobilizada</b>	3000 µL Tampão fosfato pH 7,0	300 µL PNPA/Acetona 20mmol.L <sup>-1</sup>

Fonte: Dados da pesquisa.

#### 4.3.6 Biocatálise em reações orgânicas – reação de transesterificação

Uma massa de 5mg da enzima imobilizada foi adicionada a 10µL do álcool racêmico (*RS*) -1-feniletanol e 50µL de acetato de vinila, a 25°C. Em seguida alíquotas foram retiradas após o período de 48 horas de reação e analisados por cromatografia gasosa com coluna quiral e detector de ionização em chama, conforme demonstra a tabela 5.

Tabela 5. Utilização da enzima lipase imobilizada em uma reação de transesterificação

<b>SISTEMAS</b>			
<b>Branco/ Controle</b>	-	10 µL Fenil etanol	500 µL Acetato de vinila
<b>Teste</b>	5 mg enzima imobilizada	10 µL Fenil etanol	500 µL Acetato de vinila
<b>REP Teste</b>	5 mg enzima imobilizada	10 µL Fenil etanol	500 µL Acetato de vinila

t reacional = 48h

Fonte: Dados da pesquisa.

### 4.3.7 Biocatálise em reações orgânicas – reação de síntese do aroma artificial de jasmim

Uma massa de 5mg de enzima imobilizada foi adicionada a um sistema contendo 50  $\mu$ L de acetato de vinila, 20  $\mu$ L de álcool benzílico e 2mL de hexano, em dois tempos reacionais de 12 e 48h. Foi testado ainda a reutilização da enzima imobilizada na referida síntese em 5 ciclos também a 25°C, conforme demonstra a tabela 6.

Tabela 6. Utilização da enzima lipase imobilizada em uma reação de síntese do aroma artificial de jasmim

SISTEMAS				
<b>Branco/</b>	-	50 $\mu$ L	20 $\mu$ L Álcool	2 mL hexano
<b>Controle</b>		Acetato de vinila	benzílico	
<b>Teste</b>	5 mg enzima imobilizada	50 $\mu$ L Acetato de vinila	20 $\mu$ L Álcool benzílico	2 mL hexano
<b>REP (1- 5) Teste</b>	5 mg enzima imobilizada	50 $\mu$ L Acetato de vinila	20 $\mu$ L Álcool benzílico	2 mL hexano

Fonte: Dados da pesquisa.

## 4.4 Equipamentos e Técnicas experimentais

### 4.4.1 Espectroscopia RAMAN

As medidas de espalhamento Raman por transformada de *Fourier* foram realizadas em um espectrômetro FTIR, da *Bruker Vertex70*, com módulo Ram II no Laboratório de Espectroscopia RAMAN do Departamento de Física da UFC.

Os espectros SERS e Raman normal foram obtidos no espectrômetro Micro Raman Renishaw InVia acoplado ao microscópio Leica DM2500M, com estágio motorizado Renishaw MS 20 de resoluções axial e lateral de 0,10mm, controlado pelo software WiRe 3.6, excitados com radiação em 632,8 nm (He-Ne, Renishaw) e em



785 nm (diodo, Renisaw). A radiação espalhada foi dispersa por uma grade de difração de 1200 linhas  $\text{mm}^{-1}$  e registrada por um detector CCD resfriado por peltier. As amostras foram focadas com uma lente objetiva LEICA de abertura numérica de 0,9 e magnificação de 50x. O experimento foi realizado no instituto de química da Universidade de São Paulo (USP).

#### **4.4.2 Espectroscopia Vibracional na região do Infravermelho**

Os espectros vibracionais na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofotômetro FTLA 2000-102, ABR – BOMEM, na região de 4000 a 400  $\text{cm}^{-1}$ , usando pastilhas de KBr. Para análise de amostras líquidas foi utilizado suporte de ATR na região de 4000 a 750  $\text{cm}^{-1}$ .

Os coacervatos preparados a partir da solução de polifosfato de sódio e dos sais de cloretos, na razão molar de 2:1, respectivamente, foram separados do sobrenadante e liofilizados. Em seguida, foram pesadas com o auxílio de uma balança analítica 10mg de cada amostra, misturada com uma massa de 1g de KBr previamente aquecida, macerada e prensada a fim e formar uma pastilha para a análise.

#### **4.4.3 Espectroscopia Eletrônica na região do UV-Vis**

Os espectros eletrônicos, nas regiões do visível e ultravioleta, foram registrados em um espectrofotômetro *Hewlett-Packard*, modelo 8453 *Diode Array*. Utilizou-se uma cubeta de quartzo retangular de caminho óptico de 1,0 cm. Os testes de atividades enzimáticas da lipase livre e da lipase imobilizada foram monitorados com auxílio de um espectrofotômetro FEMTO 600 S, a um comprimento de onda específico no Laboratório de Biocatálise e Produtos Naturais da UFC.

#### **4.4.4 Análise Reológica**

As medidas foram feitas pela análise *Peak Hold*, com sensor do tipo cone placa de diâmetro de 40 mm e ângulo de  $0^{\circ}59'1''$ , com taxa de cisalhamento de  $10\text{s}^{-1}$  e temperatura  $25^{\circ}\text{C}$  utilizando um reômetro modelo AR550 da *TA instruments* do Laboratório de Polímeros do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

#### **4.4.5 Análise Termogravimétrica**

As análises foram realizadas em uma balança termogravimétrica modelo TGA-50 da marca *Shimadzu* do Laboratório de Termoanálise da Pós-Graduação em Química da UFC e em uma balança termogravimétrica *Mettler-Toledo* modelo TGA/S DTA 851<sup>e</sup>

do Laboratório de Produtos e Tecnologia em Processos da UFC. Os experimentos foram feitos numa taxa de aquecimento de 10°C/min e sob atmosfera de ar sintético até temperatura de 900°C. Procurou-se assegurar massas das amostras em aproximadamente 10 mg.

#### **4.4.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)**

As imagens foram obtidas em microscópio de bancada HITACHI, modelo TM 3000 com periférico acoplado do tipo EDS SWIFT ED 3000, com 3 microscópios petrográficos, sendo dois NIKON H 550S e um LEICA DM50P, uma lupa eletrônica NIKON SZ18 e o auxílio de um equipamento de infravermelho da marca *agilent*, modelo 630 FTIR. O referido microscópio pertence ao Laboratório de Microscopia Eletrônica do Departamento de Geologia da UFC.

#### **4.4.7 Cromatografia Gasosa acoplado a Espectroscopia de massa (CG-EM)**

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/EM) foram efetuadas em aparelho Shimadzu GC/EM, modelo QP2010SE Plus usando coluna capilar Rtx®-5MS (95% dimetilpolisiloxano e 5% difenil) de 30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,1 µm de espessura do filme da fase fixa; as temperaturas do injetor e do detector foram 240 e 280°C, respectivamente; condições da coluna: 60°C para 80 a 5°C min<sup>-1</sup>, permanecendo por 3 minutos; então de 80°C min<sup>-1</sup> até 280°C, a 30°C min<sup>-1</sup>, permanecendo nesta temperatura por 10 minutos utilizando He como gás de arraste com vazão de 1,0 mL min<sup>-1</sup>. A análise com o detector de massa foi no modo *scan* com tempo de análise em 23,67 min.; o registro dos espectros de massa foi na faixa de 35 a 500 *Daltons* por impacto de elétrons (EMIE) com energia de ionização de 70 eV (voltagem de 1,5 KV), analisador do tipo quadrupolo e fonte de íons a 240°C. O referido equipamento pertence ao Laboratório de Biocatálise e produtos naturais da UFC.

#### **4.4.8 Cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização em chama (CG-DIC)**

No cálculo dos excessos enantioméricos foi utilizado cromatógrafo gasoso acoplado com detector de ionização em chama (CG/DIC), Shimadzu GC-2010 equipado com um autoinjeter AOC-20i e uma coluna capilar quiral de ciclodextrina (CP-Chirasil-Dex CB 25 m x 0,25 mm x 0,25 µm) utilizando hélio como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min<sup>-1</sup> no modo *split*, as temperaturas do injetor e do detector

foram 200 e 220°C, respectivamente. A temperatura da coluna foi programada em 80°C por 7 min, depois 10°C min<sup>-1</sup> até 120°C e, então, em 6°C min<sup>-1</sup> a partir de 120 até 200°C. O tempo total de análise foi de 24,33 min. Os excessos enantioméricos (ee) foram determinados por CG/DIC, mais precisamente através das áreas dos picos observados para cada álcool conforme a equação I a seguir.

$$ee = \frac{A-a}{A+a} \times 100 \quad (I)$$

Onde:

A = área do enantiômero em maior quantidade

a = área do enantiômero em menor quantidade

ee = excesso enantiomérico

#### 4.4.9 Ressonância magnética nuclear de <sup>1</sup>H (RMN <sup>1</sup>H)

As amostras de quitosana, sem tratamento de purificação, foram caracterizadas por Cromatografia de Permeação em gel (GPC) e por Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN <sup>1</sup>H), nessa técnica uma massa de 32 mg da amostra de quitosana foi adicionada em 600µL de D<sub>2</sub>O, depois de uma hora sob agitação magnética, foi adicionado uma gota de ácido clorídrico deuterado 99%, de procedência sigma, e então após 24 horas sob agitação o volume foi completado para 800µL utilizando D<sub>2</sub>O. Por fim, o sistema foi agitado por mais 30 minutos antes de ser analisado.

#### 4.4.10 Cromatografia de permeação em gel (GPC)

Para as medidas de GPC utilizou-se um cromatógrafo de exclusão por tamanho da marca *Viscotek*, equipado com um sistema de colunas composto por uma pré-coluna SB-G, uma coluna SB806M HQ e uma SB803 marca *Shodex Pak* e um detector refratométrico *Viscotek*. O sistema de colunas utilizado possibilita a detecção de moléculas com massa molar de até 107 Daltons. Como fase móvel, utilizou-se uma solução tampão aquosa de CH<sub>3</sub>COOH 0,33 mol.L<sup>-1</sup> e NaOH 0,1 mol.L<sup>-1</sup>. Os testes ocorrem a 40°C, com uma vazão de 0,22 mL/min. No preparo das amostras para análise, pesou-se aproximadamente 0,5 mg de amostra que foram dissolvidos em 1 mL da solução CH<sub>3</sub>COOH / NaOH. Para garantir uma boa solubilização, a amostra foi deixada por um dia em repouso. Antes da injeção foi feito uma filtragem da amostra em filtro 0,45µm (*Milipore*).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Caracterização dos precursores**

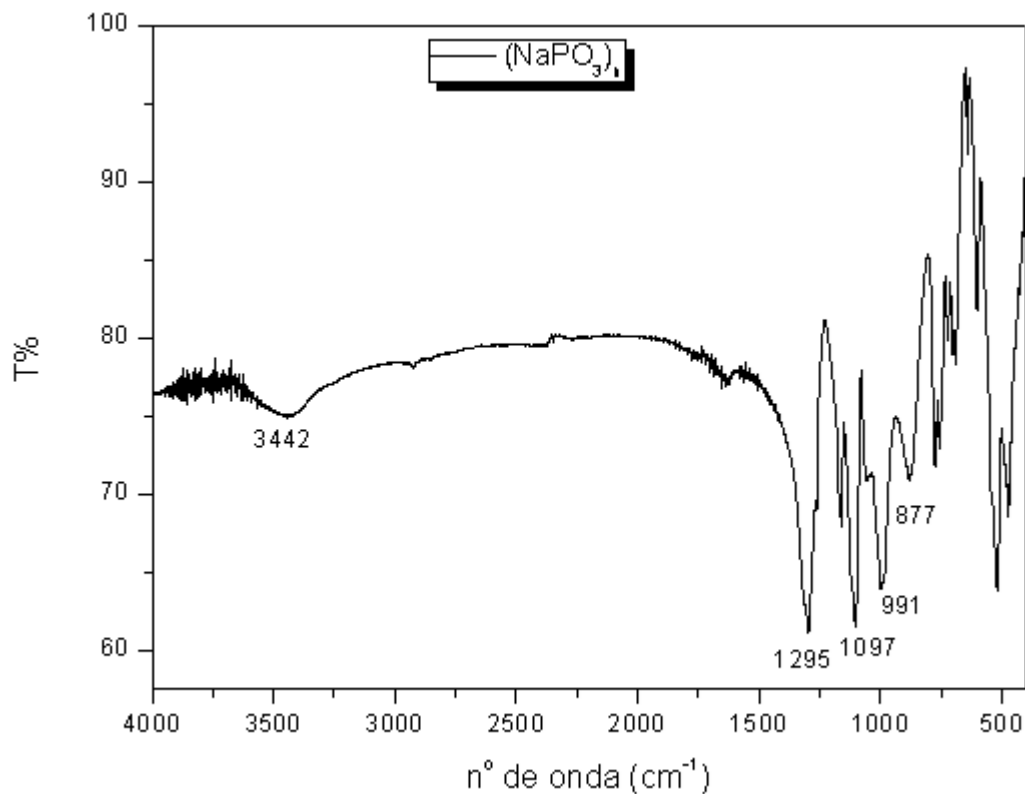
#### **5.1.1 Polifosfato de sódio**

O polifosfato de sódio é um polieletrólito aniônico que por atração eletrostática interage com cargas pontuais positivas, como íons metálicos – propriedade que justifica o estudo crescente na área acadêmica e industrial desse sal. Sendo um dos produtos possíveis do pareamento de cargas o coacervato, objeto de estudo do trabalho.

##### **5.1.1.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho**

A região “identidade” que caracteriza a cadeia polimérica do polifosfato de sódio se limita entre 1200-1300  $\text{cm}^{-1}$  (Wan,2017), conforme observado na figura 11 e as atribuições dos modos vibracionais mostrados na tabela 7. Essa região permite avaliar a integridade da cadeia antes e após a interação seja com íons metálicos ou com cadeias catiônicas.

Figura 11. Espectro vibracional do polifosfato de sódio, na forma de pastilhas de KBr.



Fonte: Próprio Autor.

Tabela 7. Principais modos vibracionais característicos do polifosfato de sódio

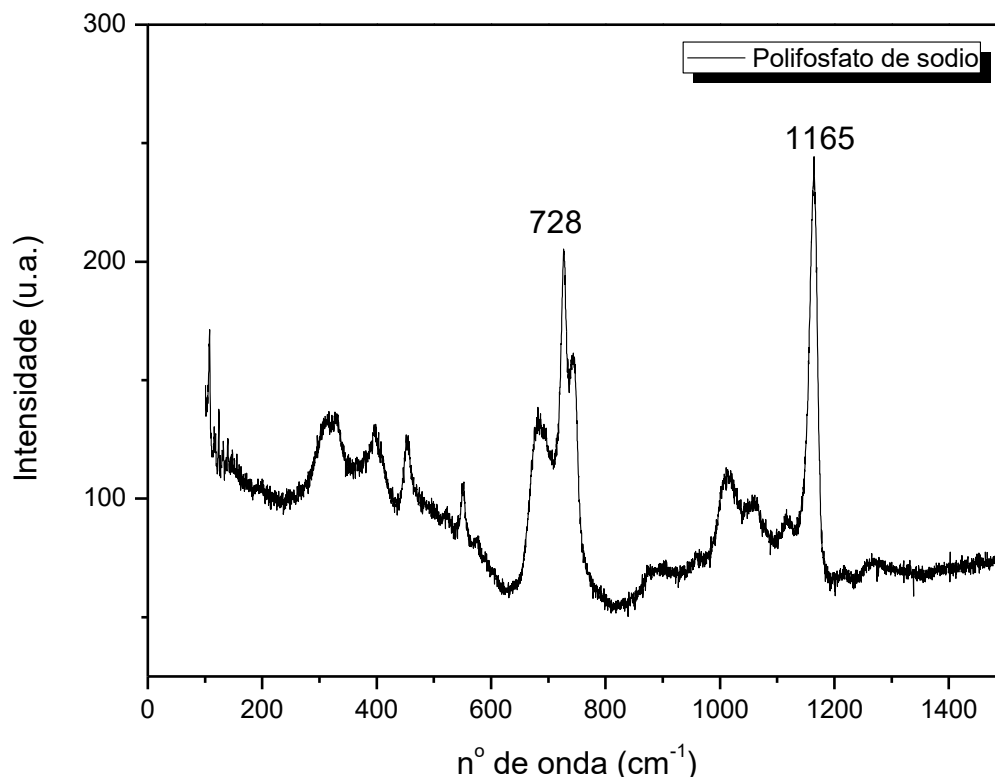
	$\text{NaPO}_3 \text{ cm}^{-1}$	Referência
$T_{\text{ambiente}}$		
$\nu_s(\text{P-O-P})$ (linear)	877	Wan, 2017
$\nu_{\text{as}}(\text{P-O-P})$ (linear)	991	Wan, 2017
$\nu_s(\text{PO}_2)$ (terminal)	1097	Wan, 2017
$\nu_{\text{as}}(\text{PO}_2^-)$ (meio cadeia)	1295	Yang, 2017
$\nu \text{ O-H}$	3442	Yang, 2017

Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.1.1.2 Espectroscopia RAMAN

No espectro Raman do polifosfato na figura 12, podemos observar a presença de bandas características dos modos de estiramento das ligações P-O, as quais estão compreendidas entre 600 e 1200  $\text{cm}^{-1}$ .

Figura 12. Espalhamento Raman do polifosfato de sódio



Fonte: Próprio Autor.

Os picos em torno de 728 e 1165 $\text{cm}^{-1}$  são, respectivamente, atribuídos aos modos de estiramento simétrico dos grupos (P-O-P) e ( $\text{PO}_2^-$ ) de fósforos pertencentes ao meio da cadeia (BROW, 2000).

### 5.1.2 Quitosana

A proposta de estudo parte do princípio de que se houver interação entre o polifosfato de sódio e a quitosana deve ser por caráter eletrostático, cargas negativas do polifosfato com as cargas positivas da quitosana. Na quitosana, as cargas positivas são geradas nos grupos aminas que podem variar em quantidade em função do grau de desacetilação (GD) da quitosana.

Durante a conversão de quitina para quitosana, os grupos acetil (onde se encontram os modos vibracionais de  $\delta \text{C}=\text{O}$  e  $\delta \text{C}-\text{H}$  de  $\text{CH}_3$ ) são perdidos, levando a

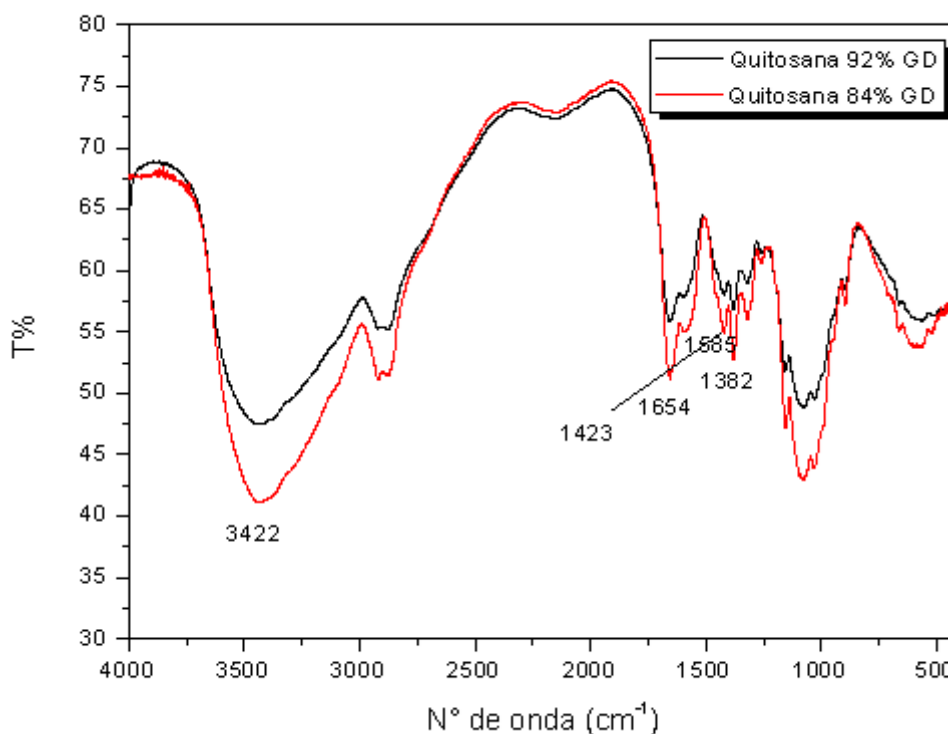
formação de grupos aminas ao longo da cadeia. A formação de grupos aminas pode ser avaliada por infravermelho, já que, uma redução na intensidade das bandas dos grupos acetil sugere uma maior perda dessas unidades e em consequência um maior grau de desacetilação (GD). Amostras de dois fabricantes foram avaliadas, duas amostras de quitosana de procedência polymar e uma amostra de quitosana da Aldrich.

As três amostras de quitosanas então utilizadas no trabalho foram caracterizadas por Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho para caracterizar a cadeia carbônica, por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio para determinação do grau de desacetilação real e por Cromatografia de Permeação em Gel (GPC) para determinação da massa molar real das amostras.

### 5.1.2.1 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

As amostras da POLYMAR foram nomeadas como 1023 (GD=92%) e 1029 (GD=84%), em referência aos lotes de fabricação. A figura 13 apresenta os espectros vibracionais das quitosanas provenientes dos dois lotes analisados.

Figura 13. Espectros vibracionais das quitosanas de procedência POLYMAR GD=92% (LOTE 1023) e GD=84% (LOTE 1029)



Fonte: Próprio Autor.

Observa-se nos espectros, um estiramento axial de O-H em  $3422\text{ cm}^{-1}$ , o qual aparece sobreposto à banda de estiramento N-H; uma deformação axial de C=O de amida ( $1654\text{ cm}^{-1}$ ); uma deformação angular de N-H de amina primária ( $1585\text{ cm}^{-1}$ ), uma deformação C-N de amida ( $1423\text{ cm}^{-1}$ ), uma deformação angular de C-H do grupo  $\text{CH}_3$  ( $1382\text{ cm}^{-1}$ ) além de bandas de estruturas polissacarídicas na região de  $1028 - 1153\text{ cm}^{-1}$ .

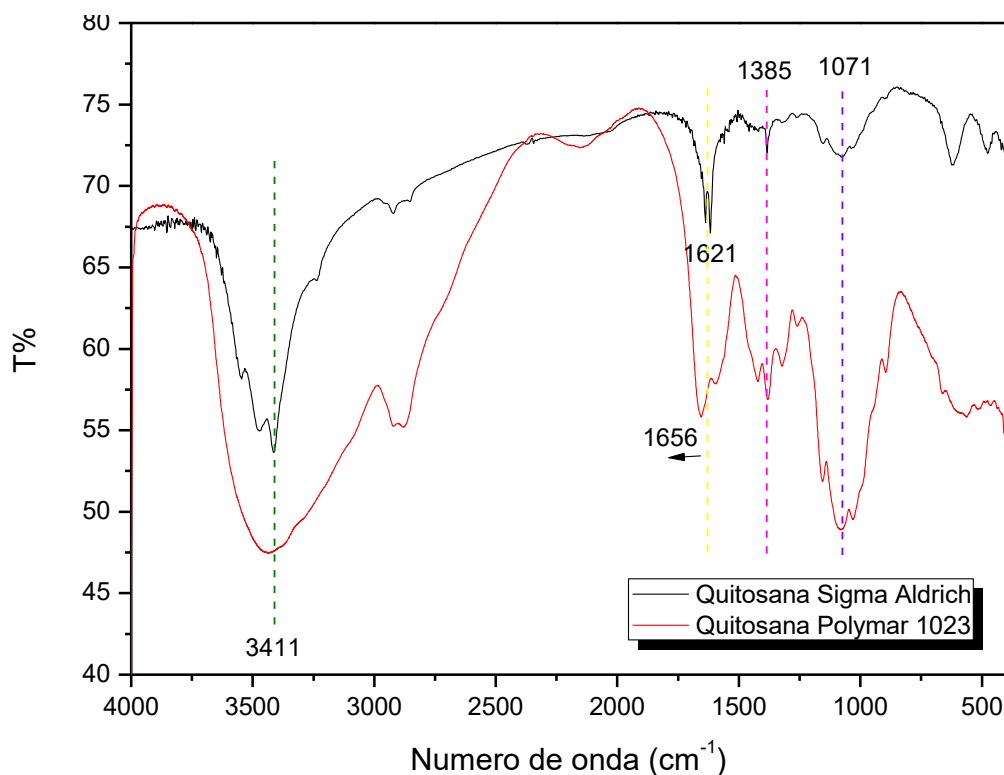
Os modos vibracionais de  $\delta\text{ C=O}$  e  $\delta\text{ C-H}$  de  $\text{CH}_3$  sugerem a presença do grupo acetamida, o que revela que sua estrutura não se encontra completamente desacetilada conforme informação do fabricante. Comparando os espectros das quitosanas nas regiões que caracterizam os modos vibracionais de  $\delta\text{ C=O}$  e  $\delta\text{ C-H}$  de  $\text{CH}_3$ , observa-se uma redução na intensidade das bandas da quitosana 1023 para quitosana 1029. Isso é esperado pois o grau de desacetilação das duas amostras é diferente.

Em princípio a quitosana 1023, por apresentar maior quantidade de grupos aminas, deveria ser a mais adequada para o estudo com polifosfato. Quanto maior a quantidade de grupos aminas maior a quantidade de cargas positivas ( $\text{NH}_3^+$ ) ao longo da cadeia de quitosana e assim maior a probabilidade de interação com as cargas negativas do polifosfato.



Comparando a quitosana de procedência da polyymar com maior grau de desacetilação (GD) de 92% e a quitosana de procedência aldrich foi observado semelhanças espectrais, conforme demonstra a figura 14.

Figura 14. Espectros vibracionais das quitosanas com GD de 92% e Aldrich



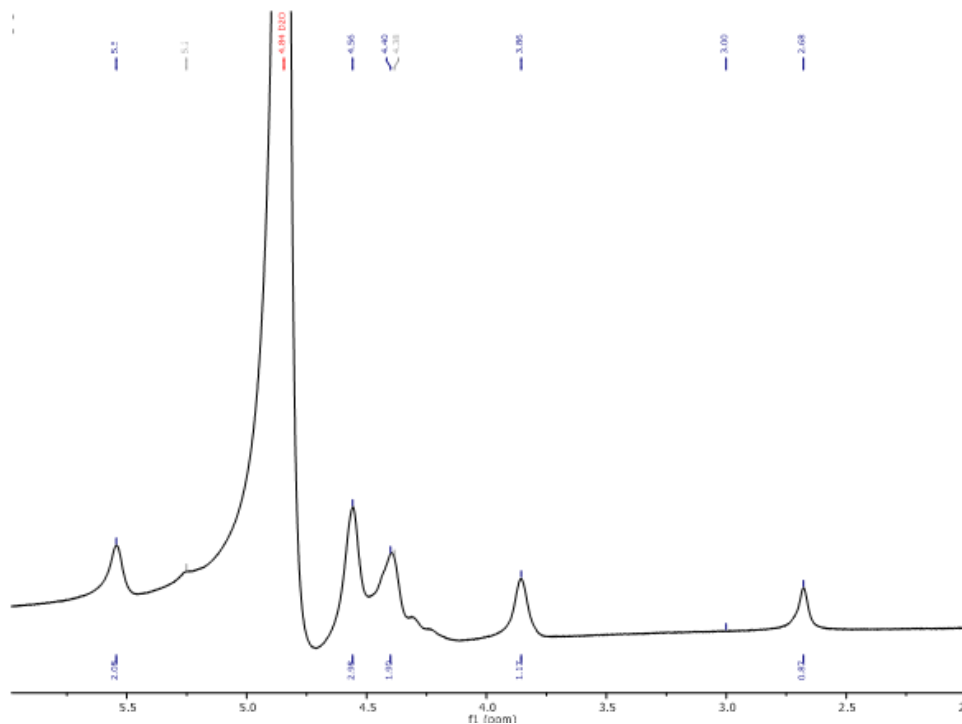
Fonte: Próprio Autor.

### 5.1.2.2 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN $^1\text{H}$ )

O grau de desacetilação é um dos parâmetros que mais influencia as propriedades da quitosana, portanto é importante confirmar o grau de desacetilação da amostra utilizada, nesse sentido RMN  $^1\text{H}$  é uma ferramenta essencial na etapa de caracterização.

A figura 15 apresenta o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana de procedência POLYMAR com GD de 92%.

Figura 15. Espectro de RMN 1H de quitosana 1023 a 70°C



Fonte: Próprio Autor.

O pico em torno de 2,70 ppm indica os hidrogênios do grupo acetil, os quais são quimicamente equivalentes, e que revela a presença do grupo acetamida ainda presente na estrutura da quitosana.

Os picos em torno de 3,85 e 5,55 ppm caracterizam os picos de hidrogênio do grupo amino e carbono 1 (C<sub>1</sub>) das unidades monoméricas desacetiladas. Os picos referentes aos hidrogênios dos carbonos 2 a 6 de glicopiranoses são observados na região compreendida entre 4-5 ppm.

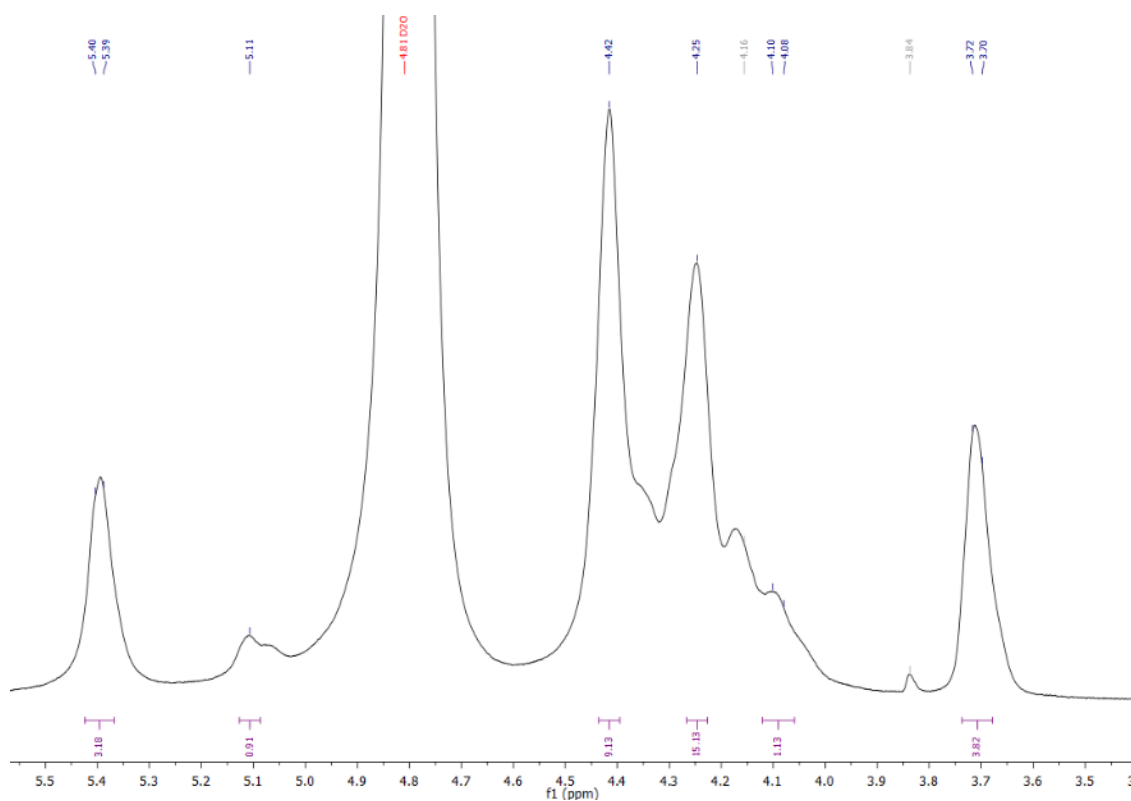
Lavertu e colaboradores (2003) propuseram a aplicação de uma fórmula para determinar o GD da amostra de quitosana a partir das integrais dos picos do próton <sup>1</sup>H do carbono 1 do monômero desacetilado (H<sub>1</sub>-D) e dos três prótons do grupo acetil (H-Ac), através da equação II:

$$GD(\%) = \left( \frac{H_1D}{H_1D + \frac{H_{AC}}{3}} \right) \times 100 \quad (II)$$

Aplicando a fórmula, foi obtido um alto grau de desacetilação, com valor real de 97,63%, diferente do especificado pelo rótulo do fabricante (GD=92%).

O mesmo procedimento foi feito para quitosana Aldrich. A figura 16 apresenta o espectro de RMN  $^1\text{H}$  da quitosana Aldrich.

Figura 16. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de quitosana sigma-aldrich a 70°C



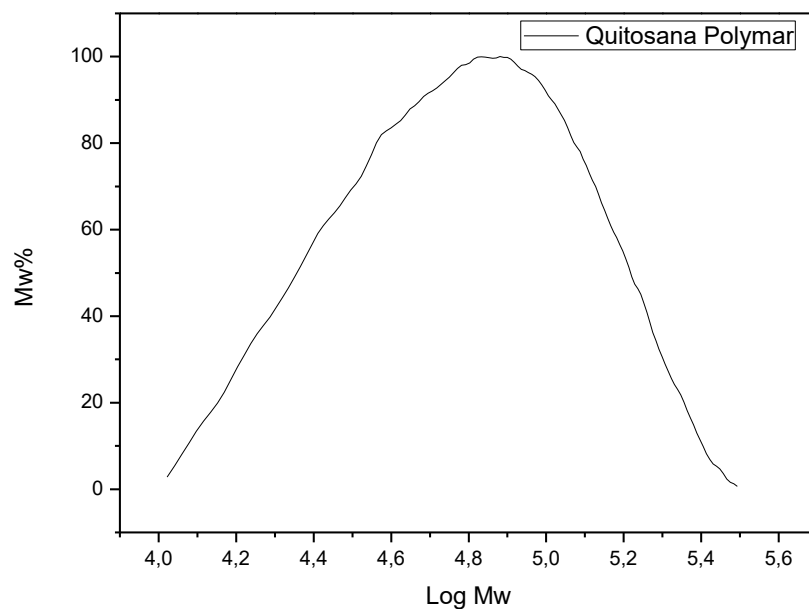
Fonte: Próprio autor, 2017.

De acordo com o fabricante o grau de desacetilação está numa faixa compreendida entre 75-85%. Aplicando a fórmula, da equação 2, foi obtido um grau de desacetilação, 77,75%.

### 5.1.2.3 Cromatografia de Permeação em Gel (GPC)

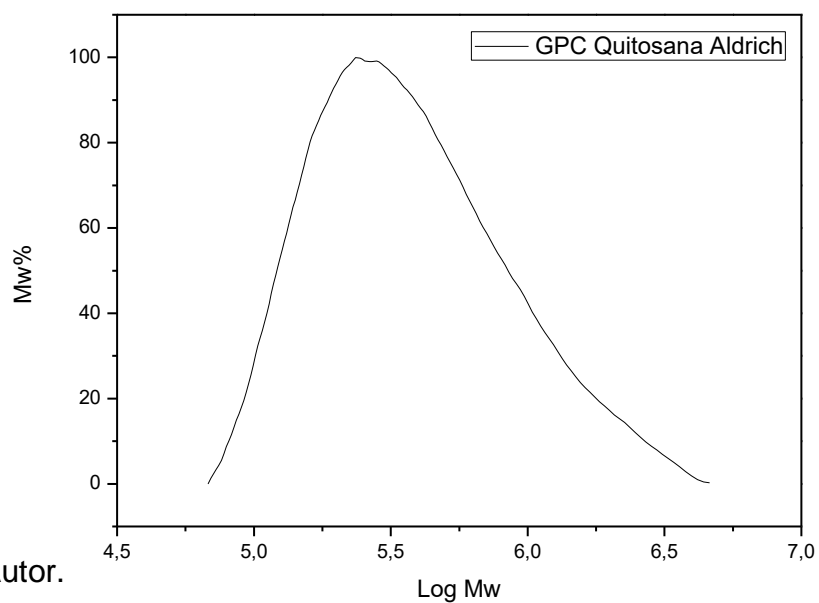
As quitosanas 1023 e da sigma-aldrich foram caracterizadas a fim de calcular a massa molar real de ambas. As figuras 17 e 18 mostram os cromatogramas para 1023 e Aldrich, respectivamente.

Figura 17. Curva GPC para a amostra de quitosana de procedência Polymar (LOTE 1023)



Fonte: Próprio Autor.

Figura 18. Curva GPC para a amostra de quitosana de procedência Sigma-aldrich.



Fonte: Próprio Autor.

A massa molar real obtida em cada amostra foi de  $8 \cdot 10^4$  g/mol para a quitosana 1023 e de  $4 \cdot 10^5$  g/mol para a quitosana Aldrich, o fabricante de ambas sugeriam uma massa molar teórica de  $1 \cdot 10^5$  g/mol, as quitosanas também diferiram com relação à polidispersividade ( $M_w/M_n$ ). A quitosona proveniente da polymer apresentou um valor em torno de 1,55 enquanto que a quitosona proveniente da sigma-aldrich apresentou um valor em torno de 1,70, o que sugere que essa última é mais homogênea. A tabela 8 compara as duas quitosanas estudadas.

Tabela 8. Propriedades da quitosana 1023 (polymer) e quitosana (Aldrich)

<b>PROPRIEDADE</b>	<b>Quitosana 1023 (POLYMER)</b>	<b>Quitosana Aldrich</b>
<b>GD (%)</b>	97,63	77,75
<b>Massa Molar Média (g/mol)</b>	$8 \times 10^4$	$4 \times 10^5$
<b>Polidispersividade</b>	1,55	1,70

Fonte: Dados da pesquisa.

## **CAPÍTULO 1 COACERVAÇÃO SIMPLES E MISTA**

## 5.2 Coacervação simples

Os resultados mostraram algumas características interessantes. Dependendo do tipo de íon metálico a formação do coacervato pode ser espontânea ou não. No caso, de coacervação não espontânea, o coacervato foi obtido pela adição de álcool etílico. O tipo de íon também influenciou na viscosidade e volume do coacervato formado

A tabela 9 reúne as informações dos 6 (seis) coacervatos obtidos, um para cada íon metálico, para os coacervatos a partir de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  foi necessário a adição de 4 mL de álcool etílico à 27°C a fim de diminuir a polaridade do sistema e forçar a coacervação, que inicia instantaneamente.

Tabela 9. Resultados da influência do íon metálico na coacervação

<b>Composição dos coacervatos</b>	<b>V<sub>coacervato</sub></b> (mL)	<b>V<sub>sobrenadante</sub></b> (mL)	<b>pH</b> sobrenadante
<b>NaPO<sub>3</sub>/Ca</b>	3,0	17,0	1,95
<b>NaPO<sub>3</sub>/Mg</b>	3,6	16,4	2,03
<b>NaPO<sub>3</sub>/Mn</b>	3,5	16,5	1,60
<b>NaPO<sub>3</sub>/Zn*</b>	3,0	21,0	1,55
<b>NaPO<sub>3</sub>/Co*</b>	3,6	20,4	1,51
<b>NaPO<sub>3</sub>/Cu*</b>	3,0	21,0	0,86

\* adição de álcool etílico

Fonte: Dados da pesquisa.

Com o auxílio de uma bureta, foram aferidos os volumes dos coacervatos formados para cada sistema, assim como o volume do sobrenadante. Observou-se valores de pH mais baixo dos sobrenadantes para os sistemas em que coacervação foi não espontânea o que pode ser justificado pela hidrólise dos respectivos sais metálicos. Na tabela 6, têm-se valores reportados da literatura de raio iônico e entalpia de hidratação que podem ser usados para explicar as observações experimentais obtidas.

Tabela 10. Grandezas físico-químicas dos íons metálicos (OLIVEIRA *et al.*, 2008)

Íons metálicos	Raio iônico ( <i>pm</i> )	$\Delta H_{\text{hid.}}$ (Kj/mol)
(Ca <sup>2+</sup> )	106	-1577
(Mg <sup>2+</sup> )	78	-2003
(Mn <sup>2+</sup> )	91	-1841
(Co <sup>2+</sup> )	82	-1996
(Zn <sup>2+</sup> )	83	-2046
(Cu <sup>2+</sup> )	72	-2100

Fonte: Dados da pesquisa.

Quando se analisa a interação entre soluções aquosas de polifosfato de sódio e dos sais divalentes têm-se, no primeiro momento, a ideia de que a condição necessária para a formação do coacervato está relacionada somente à carga do íon metálico. Entretanto, os resultados mostram que a carga não parece ser o único fator determinante para o processo. A entalpia de hidratação dos íons metálicos ( $\Delta H_{\text{hidratação}}$ ) sugere uma explicação para os casos em que não houve formação do coacervato, quanto mais negativo for o valor da  $\Delta H_{\text{hidratação}}$ , mais forte é a interação da água com o íon metálico, dificultando assim que haja uma efetiva interação entre o íon e a cadeia do polifosfato de sódio. Os íons Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> apresentam os valores mais negativos de entalpia, o Co<sup>2+</sup> apresenta um valor de  $\Delta H_{\text{hidratação}}$  semelhante ao valor do Mg<sup>2+</sup>, porém o raio iônico do Co<sup>2+</sup> é maior que implica em uma carga mais espalhada que também dificulta a coacervação.

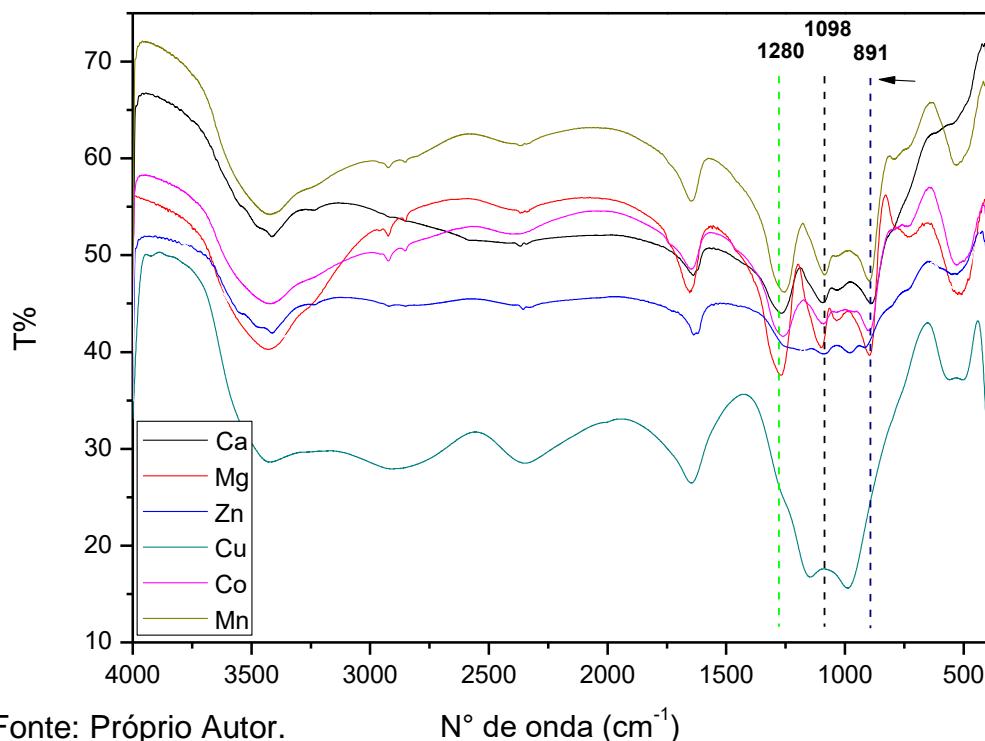
### 5.2.1 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

A figura 19 mostra os espectros vibracionais dos coacervatos após liofilização. Em todos os espectros observa-se um deslocamento, para menor energia, dos modos vibracionais  $\nu_{\text{as}}$ (P-O-P),  $\nu_{\text{s}}$ (P-O-P) e  $\nu_{\text{as}}$ (PO<sub>2</sub><sup>-</sup>) que caracterizam a existência da cadeia de fosfato. A distribuição de cargas negativas ao longo da cadeia de polifosfato condiciona apenas dois sítios de coordenação com os metais, no meio da cadeia ou no final da cadeia. Os deslocamentos das bandas sugerem que os sítios de ligação



do metal no polifosfato ocorrem preferencialmente no meio da cadeia. Os modos vibracionais observados nos espectros dos coacervatos são apresentados na tabela 11.

Figura 19. Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto, na forma de pastilhas de KBr.



Fonte: Próprio Autor.

Nº de onda ( $\text{cm}^{-1}$ )

Tabela 11. Modos vibracionais, característicos do polifosfato, nos coacervatos e no polifosfato

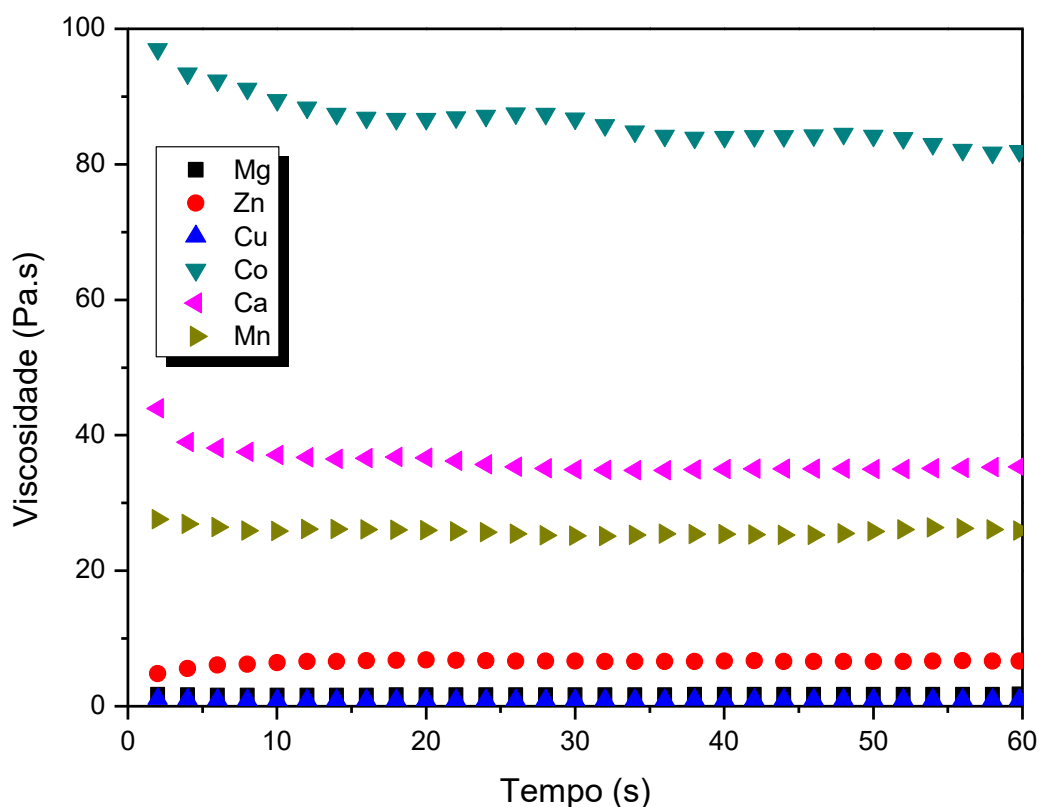
Grupos fosfatos	Coacervatos						
	NaP O <sub>3</sub>	Ca	M g	M n	C o	Zn	C u
$\nu_s(\text{P-O-P})$ (linear)	872	89 1	90 1	90 1	90 5	97 4	89 8
$\nu_s(\text{PO}_3)$ (terminal)	109 4	10 88	10 90	10 84	10 90	10 84	10 88
$\nu_{as}(\text{PO}_2^-)$ (meio cadeia)	127 6	12 63	12 66	12 53	12 45	12 35	12 55

Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.2.2 Análise Reológica

Os coacervatos foram analisados por reologia de fluxo contínuo. As medidas reológicas dos coacervatos foram obtidas, em duplicatas, após o processo de coacervação de 3 horas e um tempo adicional de 1 hora para que os sistemas (sobrenadante e coacervato) entrassem em equilíbrio. É sabido que cadeias poliméricas lineares como a do polifosfato demonstram relativa viscosidade (MOMENI, 2016). Especificamente nos coacervatos, a viscosidade mostrou ser dependente do tipo de íon metálico usado na coacervação como mostrado na figura 20.

Figura 20. Curvas reológicas peak hold de fluxo contínuo dos coacervatos simples a partir de sais de cloreto



Fonte: Próprio Autor.

Vale ressaltar que o tempo escolhido de um minuto foi devido a elevada afinidade do polifosfato de sódio por metais sendo os utensílios utilizados, durante a análise, de composição metálica. Para garantir a integridade do equipamento houve uma redução do tempo da análise, e as amostras foram realizadas em duplicata.

A dependência da viscosidade em função do tipo de íon metálico envolvido na coacervação reforça a ideia de que a carga do íon não é condição única para que haja formação de coacervatos. Outros fatores devem ser considerados. Pela interpretação da figura 18, uma ordem de viscosidade pode ser sugerida para os coacervatos a partir de cloretos:  $\text{Cu}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Ca}^{2+} < \text{Co}^{2+}$ . Entretanto, é importante ressaltar que os coacervatos de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  foram formados pela adição de álcool. Separando em dois grupos, os coacervatos formados espontaneamente e os coacervatos que se formam não espontaneamente, tem-se a seguinte ordem crescente de viscosidade:

Coacervatos formados espontaneamente	$\text{Mg}^{2+} < \text{Mn}^{2+} < \text{Ca}^{2+}$
Coacervatos formados não espontaneamente	$\text{Cu}^{2+} < \text{Zn}^{2+} < \text{Co}^{2+}$

Primeiramente, serão analisados os coacervatos obtidos espontaneamente. Pelos resultados de reologia, o coacervato de Ca apresentou a maior viscosidade frente aos coacervatos de Mg e Mn. Relembrando os valores de raio iônico e entalpia de hidratação do  $\text{Ca}^{2+}$ , vê-se que a interação do  $\text{Ca}^{2+}$  com o polifosfato é maior já que o coacervato de  $\text{Ca}^{2+}$  foi o que apresentou maior viscosidade, ou seja, mais ligado estão íons e cadeia e, conseqüentemente, menor a fluidez. Na outra extremidade se encontra o coacervato de Mg que apresentou a menor viscosidade, ou seja, a ligação entre  $\text{Mg}^{2+}$  e polifosfato é mais fraca, por conseguinte, o coacervato tem maior fluidez (menor viscosidade).

O  $\text{Ca}^{2+}$  tem 106 pm de raio iônico enquanto o  $\text{Mg}^{2+}$  possui raio iônico igual a 78pm. Baseado nos valores de viscosidade, íons maiores seriam mais susceptíveis à formação de coacervato e, portanto, mais fortemente ligados ao polifosfato. Mesma conclusão é obtida quando se confronta os valores de viscosidade com a entalpia de hidratação dos íons. O  $\text{Ca}^{2+}$  tem entalpia de hidratação igual a  $-1577$  kJ/mol enquanto no  $\text{Mg}^{2+}$  a entalpia de hidratação é igual a  $-2003$  kJ/mol. Como discutido anteriormente, a interação da água com os íons metálicos é maior quanto mais negativo for a entalpia de hidratação. Portanto, raios iônicos grandes e baixos valores de entalpia de hidratação são parâmetros que devem ser considerados na formação dos coacervatos.

A coacervação mista se caracteriza pela adição de mais de um cátion divalente para a promoção da coacervação, os sistemas foram testados e reunidos em 3 grupos, pois dentre os metais utilizados existem aqueles que promovem a coacervação sem a necessidade de aditivos na reação, são eles:  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ . Observou-se então que, a simples presença desses íons no meio promove a formação espontânea dos coacervatos em combinação com outros íons metálicos e daí esses foram então nomeados de íons formadores.

A entalpia de hidratação dos íons metálicos ( $\Delta H_{\text{hidratação}}$ ) sugere uma explicação adicional, que complementa a observação dos raios iônicos, para os casos em que não houve formação do coacervato, quanto mais negativo for o valor da  $\Delta H_{\text{hidratação}}$ , mais forte é a interação da água com o íon metálico, dificultando assim que haja uma efetiva interação entre o íon e a cadeia do polifosfato de sódio. Os íons  $Cu^{2+}$  e  $Zn^{2+}$  apresentam os valores mais negativos de entalpia o que explicaria esses íons serem íons não formadores de coacervato; já o  $Co^{2+}$  apresenta um valor de  $\Delta H_{\text{hidratação}}$  semelhante ao valor do  $Mg^{2+}$ , porém o raio iônico do  $Co^{2+}$  é maior o que implica em uma carga mais espalhada o que também dificulta a coacervação.

Ao colocar o álcool para promover a coacervação no caso do  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Co^{2+}$  os valores das viscosidades dos coacervatos não podem ser confrontados com a entalpia de hidratação como feito para os coacervatos de  $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  e  $Mn^{2+}$ . A presença do álcool diminui a interação das moléculas de água com os íons. Por outro lado, o raio iônico não sofre alteração na presença do álcool. Analisando os resultados da reologia para os coacervatos obtidos não espontaneamente, observa-se que o coacervato de Co foi o que apresentou viscosidade mais alta frente aos coacervatos de Cu e Zn. O raio iônico do  $Co^{2+}$  é igual a 82pm (coacervato mais viscoso) enquanto raio iônico do  $Cu^{2+}$  é igual a 72pm (coacervato menos viscoso). Vê-se, portanto, que para os coacervatos não espontâneos o raio iônico passa a ter maior influência na formação dos coacervatos do que a entalpia de hidratação do íon metálico.

### 5.3 Coacervação mista

Os íons metálicos que formam coacervato espontaneamente,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ , foram divididos em grupos com os outros íons que necessitam da adição de etanol para a obtenção do coacervato,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  a fim de avaliar a influência daqueles na condição de facilitadores na coacervação. Neste caso, as soluções dos íons metálicos eram compostas de dois íons ( $\text{M}_A^{2+}$  e  $\text{M}_B^{2+}$ ), por isso, a nomenclatura de **coacervação mista**. O volume da solução do íon  $\text{M}_A^{2+}$  somado ao volume da solução do íon  $\text{M}_B^{2+}$  sempre era igual a 10 mL, mesmo volume usado na coacervação simples. Usou-se a seguinte notação para melhor entendimento  **$\text{M}_A\text{M}_B\text{x}$** , onde:

- $\text{M}_A$  → íon formador ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  ou  $\text{Mn}^{2+}$ )  
 $\text{M}_B$  → íon não formador ( $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  ou  $\text{Cu}^{2+}$ )  
 $\text{x}$  → volume da solução do íon formador

Desta forma, a notação  $\text{CaCo}2,5$  significa que a solução dos cátions foi feita pela mistura de 2,5mL da solução de  $\text{Ca}^{2+}$  com 7,5mL da solução de  $\text{Co}^{2+}$ . As tabelas de 12 a 14 compilam informações dos coacervatos mistos formados com os seguintes íons formadores para Ca, Mg e Mn, respectivamente.

Tabela 12. Informações sobre os coacervatos mistos com  $\text{Ca}^{2+}$  como íon formador

Sistemas com cálcio	$V_{\text{Ca}}(\text{mL})$	$V_{\text{ion}}(\text{mL})$	$V_{\text{coacervato}}(\text{mL})$	$V_{\text{sobrenadante}}(\text{mL})$	pH sobrenadante
<b>Ca/Zn</b>	2,5	7,5	2,4	17,6	1,72
<b>Ca/Zn</b>	5	5	2,5	17,5	1,67
<b>Ca/Zn</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,2</b>	<b>16,8</b>	<b>1,89</b>
<b>Ca/Co</b>	2,5	7,5	3,0	17,0	1,35
<b>Ca/Co</b>	5	5	4,0	16,0	1,73
<b>Ca/Co</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>4,2</b>	<b>15,8</b>	<b>1,35</b>
<b>Ca/Cu</b>	2,5	7,5	1,3	18,7	1,03
<b>Ca/Cu</b>	5	5	2,2	17,8	1,12
<b>Ca/Cu</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,9</b>	<b>16,1</b>	<b>1,13</b>

\* pH sobrenadante

Fonte: Dados da pesquisa.

Em todos os sistemas com  $\text{Ca}^{2+}$  observou-se a formação de coacervato. Os resultados reforçam o papel do cálcio como o íon facilitador mais forte entre os três analisados.

Tabela 13. Informações sobre os coacervatos mistos com  $\text{Mg}^{2+}$  como íon formador

<b>Sistemas com magnésio</b>	$V_{\text{Mg}}(\text{mL})$	$V_{\text{m}}(\text{mL})$	$V_{\text{coacervato}}(\text{mL})$	$V_{\text{sobrenadante}}(\text{mL})$	<b>pH</b> sobrenadante
<b>Mg/Zn</b>	2,5	7,5	1,0	19,0	1,66
<b>Mg/Zn</b>	5	5	1,3	18,7	1,99
<b>Mg/Zn</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,6</b>	<b>16,4</b>	<b>1,99</b>
<b>Mg/Co</b>	2,5	7,5	-	20,0	1,68
<b>Mg/Co</b>	5	5	1,4	18,6	1,87
<b>Mg/Co</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,4</b>	<b>16,6</b>	<b>1,81</b>
<b>Mg/Cu</b>	2,5	7,5	-	20,0	1,01
<b>Mg/Cu</b>	5	5	-	20,0	1,05
<b>Mg/Cu</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	-	<b>20,0</b>	<b>1,18</b>

Fonte: dados da pesquisa

Dentre os íons metálicos que formam coacervato espontaneamente, o íon de  $\text{Mg}^{2+}$  é o que apresenta o menor raio iônico, com valor próximo aos raios dos outros íons metálicos o que favorece uma competição dentre as espécies pela interação com os sítios carregados do polímero. Em alguns sistemas não houve a formação de coacervato ainda que permanecessem por mais de 3 horas sob agitação magnética, são os que não apresentam volume de coacervato nas tabelas.

Tabela 14. Informações sobre os coacervatos mistos com  $Mn^{2+}$  como íon formador

<b>Sistemas com manganês</b>	<b><math>V_{Mn}(mL)</math></b>	<b><math>V_m(mL)</math></b>	<b><math>V_{coacervato}(mL)</math></b>	<b><math>V_{sobrenadante}(mL)</math></b>	<b>pH sobrenadante</b>
<b>Mn/Zn</b>	2,5	7,5	2,5	17,5	1,66
<b>Mn/Zn</b>	5	5	3,0	17,0	2,00
<b>Mn/Zn</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>4,5</b>	<b>15,5</b>	<b>1,81</b>
<b>Mn/Co</b>	2,5	7,5	2,0	18,0	1,63
<b>Mn/Co</b>	5	5	2,5	17,5	1,71
<b>Mn/Co</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,7</b>	<b>16,3</b>	<b>1,68</b>
<b>Mn/Cu</b>	2,5	7,5	-	20,0	0,93
<b>Mn/Cu</b>	5	5	2,4	17,6	1,08
<b>Mn/Cu</b>	<b>7,5</b>	<b>2,5</b>	<b>3,5</b>	<b>16,5</b>	<b>1,17</b>

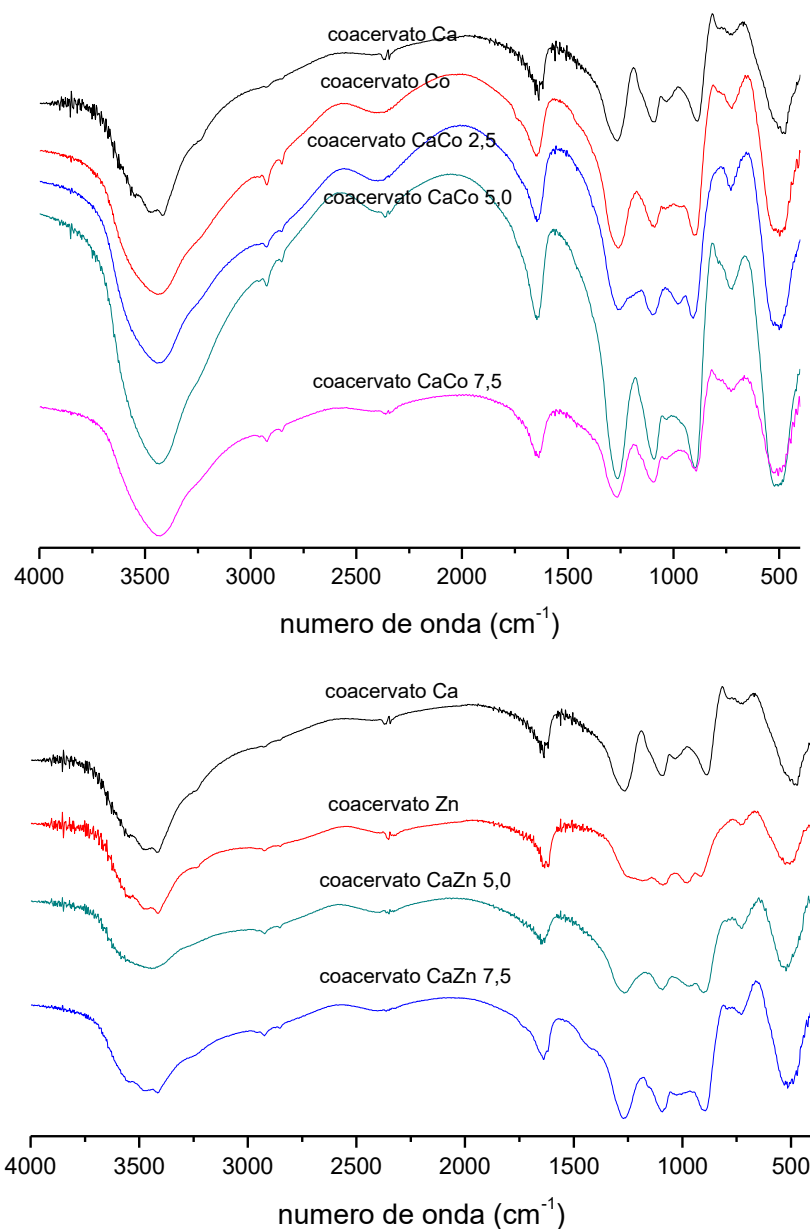
Fonte: Dados da pesquisa.

Os seis íons metálicos analisados foram divididos em dois grupos, o dos íons formadores de coacervato ( $Ca^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  ou  $Mn^{2+}$ ) e dos íons não-formadores ( $Co^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  ou  $Cu^{2+}$ ), como já definido coacervação mista seria a mistura de dois íons metálicos, nesse caso, um formador e um não-formador a fim de avaliar a influência do íon formador na indução da coacervação. Logo, os sistemas (CaCo e CaCu, MgCo e MgCu, MnCo e MnCu) foram caracterizados por Espectroscopia vibracional na região do infravermelho, pela Espectroscopia RAMAN e Análise Reológica.

### 5.3.1 Espectroscopia Vibracional na região do infravermelho

Os espectros dos coacervatos obtidos via coacervação mista a partir dos grupos de  $Ca^{2+}$  (figura 21), de  $Mg^{2+}$  (figura 22) e de  $Mn^{2+}$  (figura 23), previamente liofilizados são mostrados a seguir.

Figura 21. Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto do grupo do cálcio, na forma de pastilhas de KBr



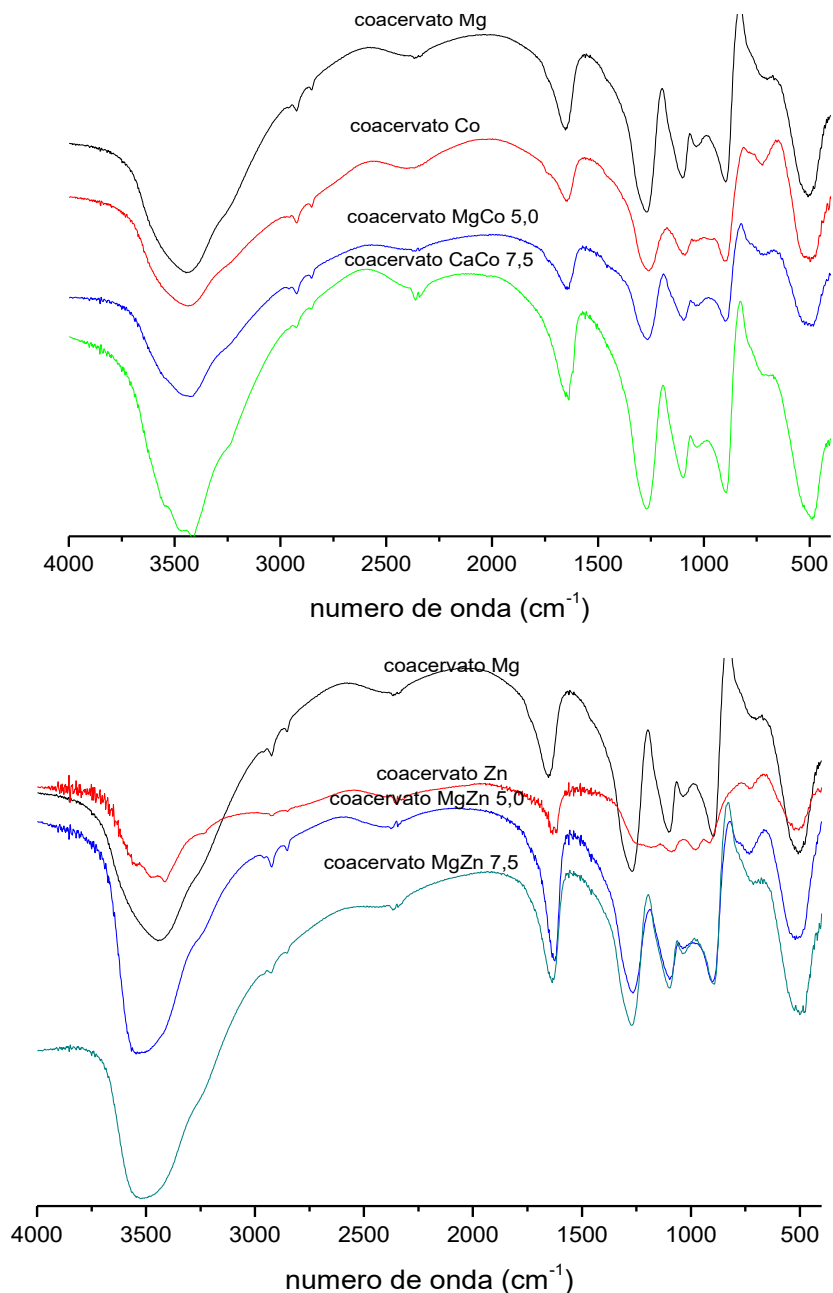
Fonte: Próprio Autor.

A posição das bandas referentes aos modos vibracionais do polifosfato demonstraram discretos deslocamentos em virtude da presença dos íons metálicos. A coacervação exige um rearranjo estrutural da cadeia polimérica de polifosfato de sódio, logo deslocamentos são esperados e foram observados, porém, a presença das bandas que caracterizam a cadeia do polímero precursor sugere que a coacervação de um ou dois íons metálicos não quebra a cadeia e sim, a incorporação ocorre devido a uma mudança na conformação da cadeia.



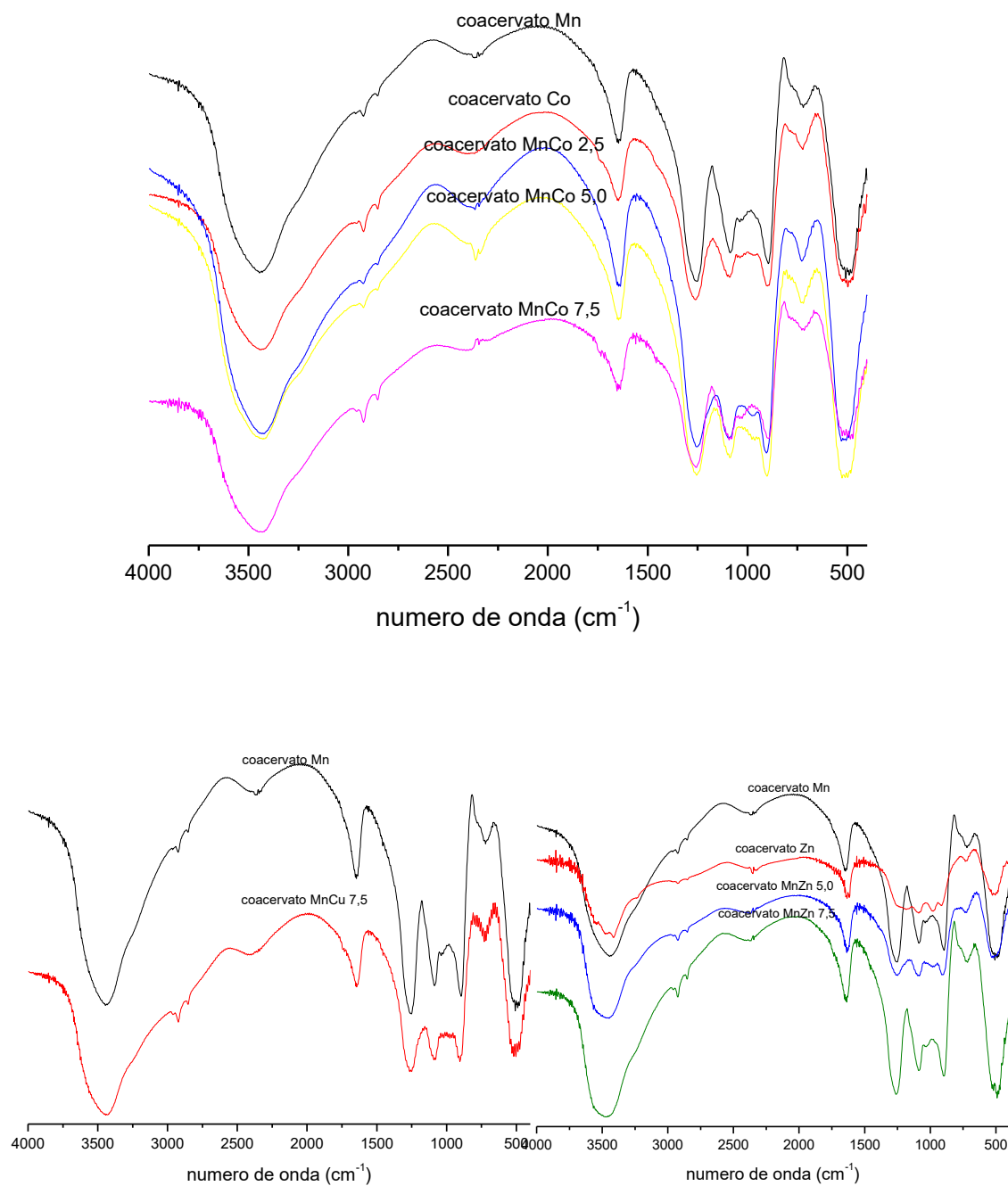
Devido à alta higroscopicidade dos coacervatos de cobre não foi possível obter os espectros de infravermelho. Isso ocorreu, inclusive, nos coacervatos com Mg e Mn.

Figura 22. Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto do grupo do magnésio, na forma de pastilhas de KBr



Fonte: Próprio Autor.

Figura 23. Espectros vibracionais dos coacervatos a partir de polifosfato de sódio e sais de cloreto do grupo do manganês, na forma de pastilhas de KBr.

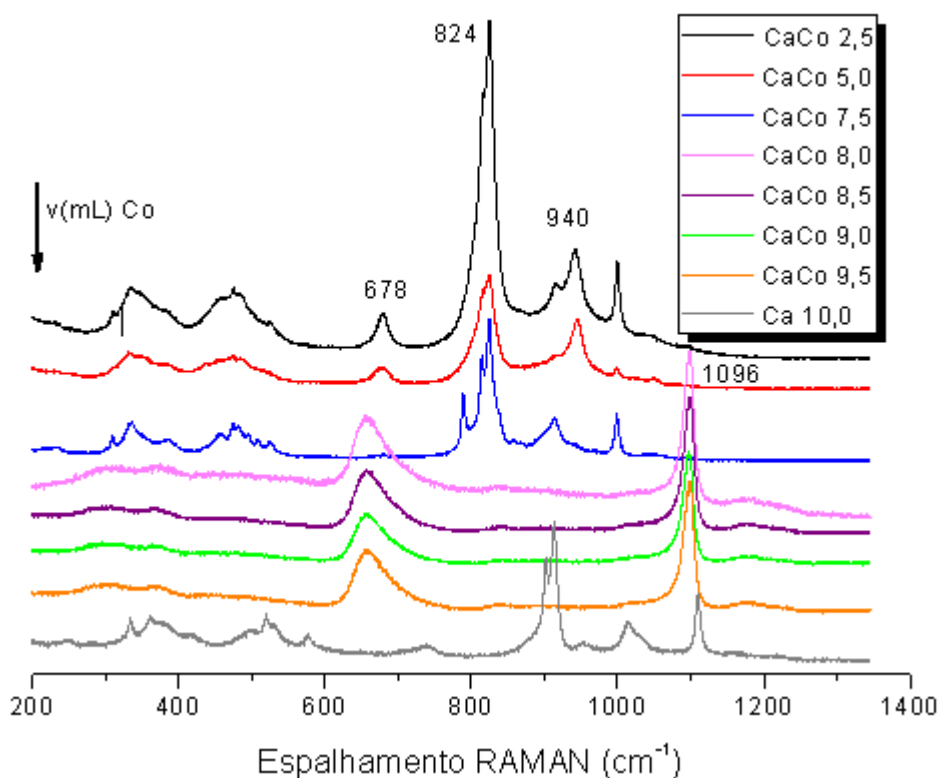


Fonte: Próprio Autor.

### 5.3.2 Espectroscopia RAMAN

Uma forma complementar do Infravermelho é a Espectroscopia RAMAN. Foram analisados grupos tendo como íon formador de coacervato o cálcio, magnésio e manganês representados nas figuras 24, 25 e 26, respectivamente. Para o grupo do Cálcio (o íon que demonstrou ser o melhor formador/indutor de coacervato pelo maior número de coacervatos formados variando o cátion não formador e as proporções volumétricas entre eles) foi testado diferentes combinações volumétricas entre  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$ , partindo de 2,5 mL de  $\text{Ca}^{2+}$ (CaCo2,5) até a situação de 10,0 mL de  $\text{Ca}^{2+}$ (Ca10,0) adicionados a 10,0 mL de polifosfato de sódio.

Figura 24. Espalhamento RAMAN para os coacervato a partir dos sistemas CaCo



Fonte: Próprio Autor.

Para os grupos do magnésio e manganês como íons formadores foram avaliados além de diferentes combinações volumétricas (íon formador: íon não formador), o íon não formador foi variado  $\text{Zn}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  para os sistemas em que houve formação do coacervato.

Figura 25. Espalhamento RAMAN para os coacervato a partir do Grupo do magnésio

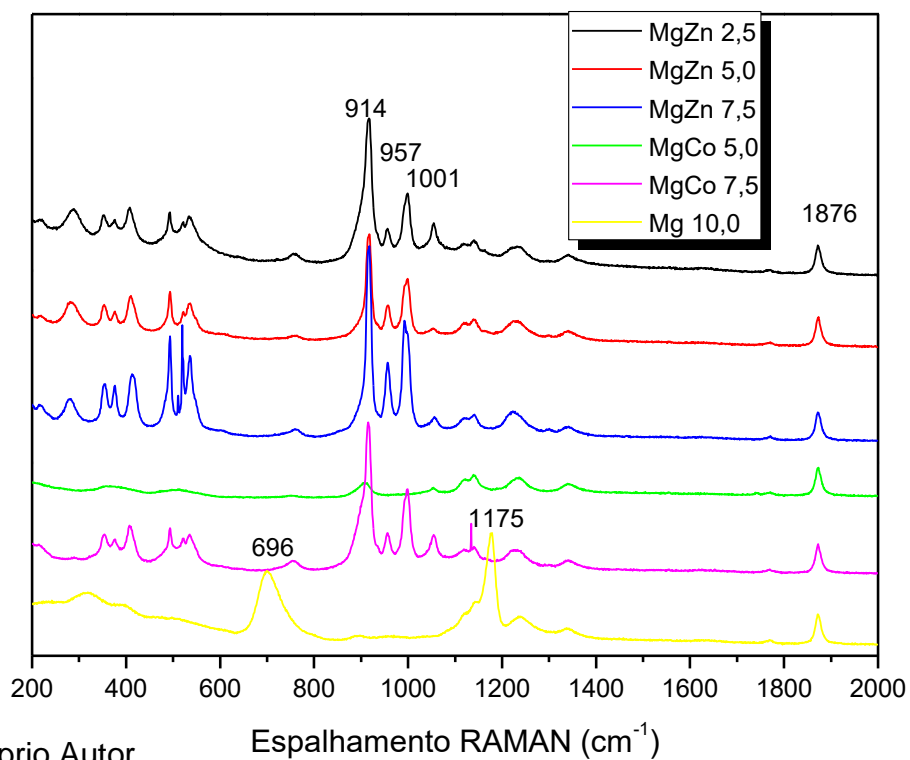
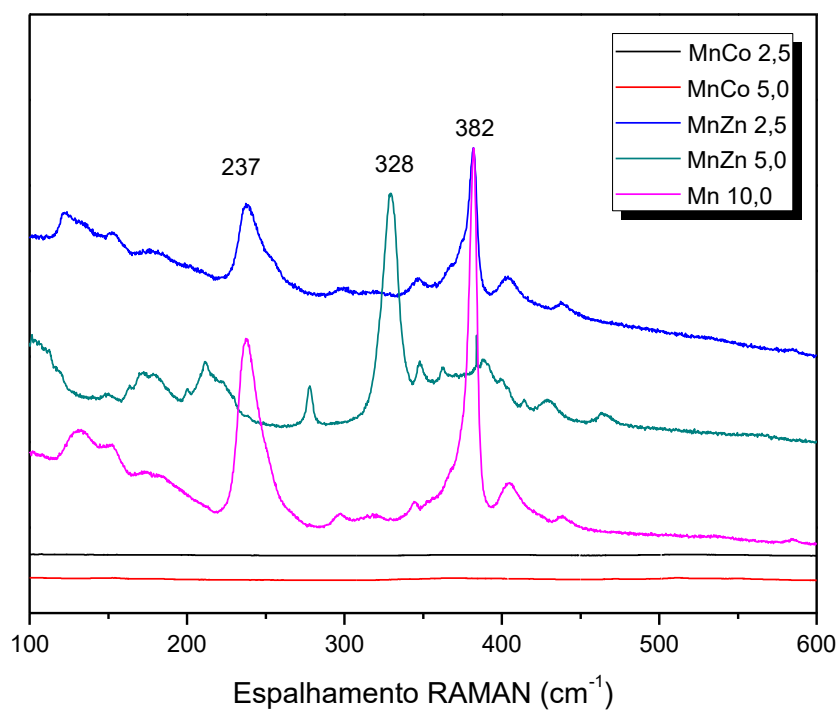


Figura 26. Espalhamento RAMAN para os coacervato a partir do Grupo do manganês



Fonte: Próprio Autor.

Os espectros sugerem a participação do modo vibracional referente ao estiramento  $\nu$  ( $\text{PO}_2$ ) de oxigênios do meio da cadeia polifosfato na coordenação com o (s) íon (s)  $\text{A}^{2+} \text{B}^{2+}$ , sendo A um íon formador e B um íon não formador.

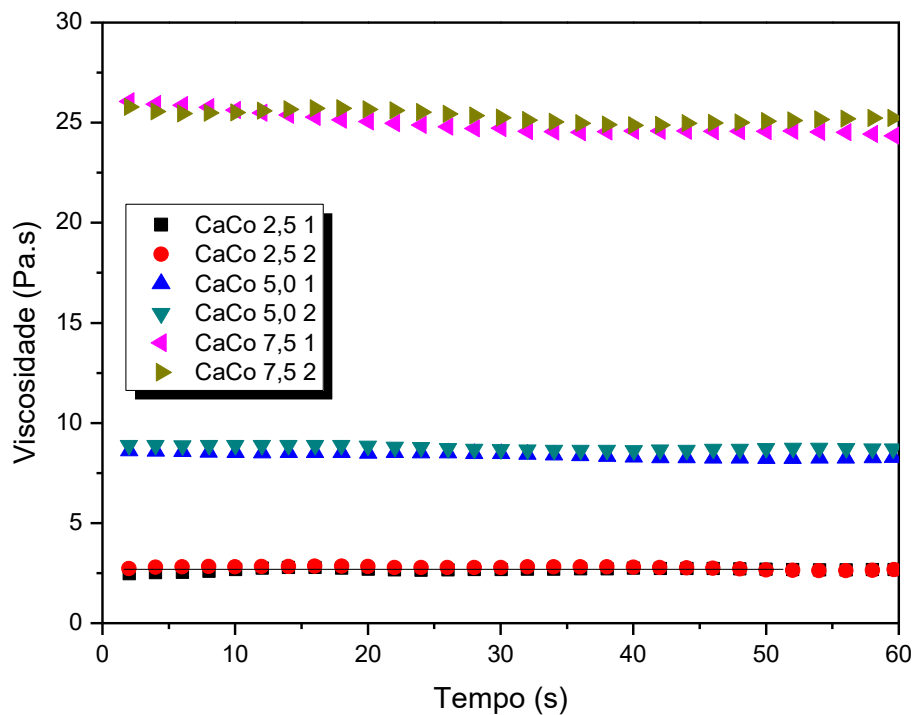
Os picos em torno de  $684 \text{ cm}^{-1}$  e  $1160 \text{ cm}^{-1}$  são, respectivamente, atribuídos aos modos de estiramento simétricos dos grupos (P-O-P) e ( $\text{PO}_2$ ) de fósforos do meio da cadeia. A largura do pico no sinal Raman pode ser associada com um maior grau de desordem que pode ser decorrente de mudanças nas distribuições dos comprimentos e ângulos de ligação P-O nas espécies  $\text{Q}^2$ , a presença de um íon a mais sugere que essa nova coordenação diminui a entropia dos sistemas (sugeridos pelo estreitamento das bandas para coacervação mista) (Franco, 2016).

### 5.3.3 Análise Reológica

Os coacervatos mistos foram analisados por reologia de fluxo contínuo em duplicata. Nem todas as combinações propostas no trabalho para a coacervação mista foram avaliadas. Avaliou-se o efeito do  $\text{Ca}^{2+}$  como íon formador na viscosidade dos coacervatos CaCo e CaCu. Essa escolha foi baseada pela formação espontânea de coacervato nas referidas combinações. As curvas para os coacervatos CaCo são apresentadas na figura 27 e as curvas para os coacervatos CaCu são apresentadas na figura 28.

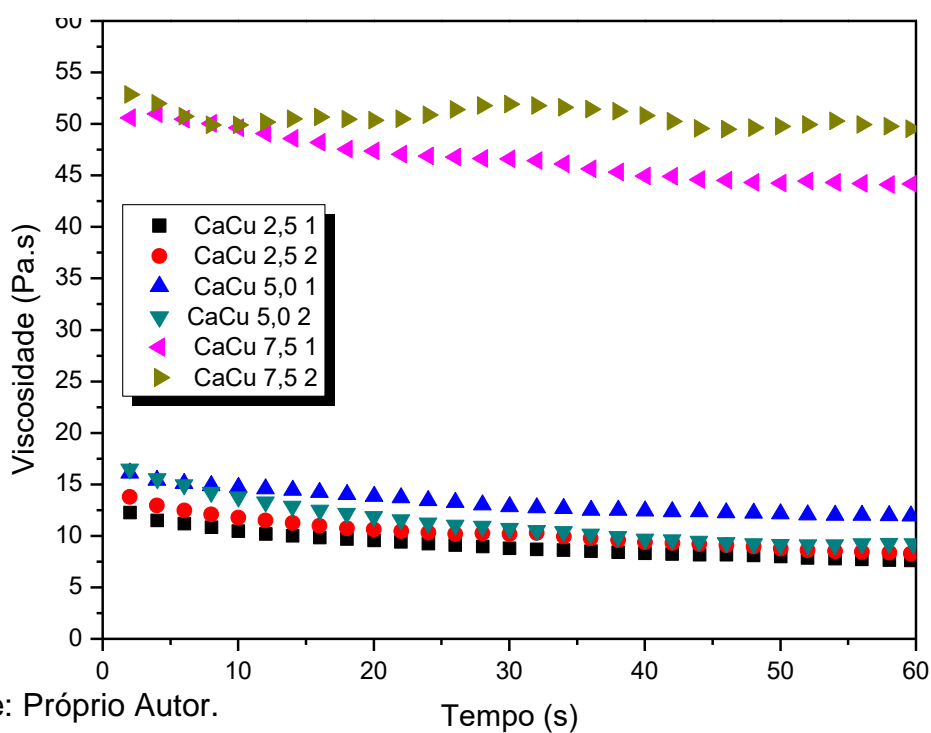
Os resultados demonstrados na figura 27 para o sistema CaCo sugerem que quanto maior a participação do íon formador, no caso o  $\text{Ca}^{2+}$ , maior a viscosidade o que pode ser também observado visualmente em todos os casos.

Figura 27. Curvas reológicas peak hold de fluxo contínuo dos coacervatos CaCo



Fonte: Próprio Autor.

Figura 28. Curvas reológicas peak hold de fluxo contínuo dos coacervatos CaCu

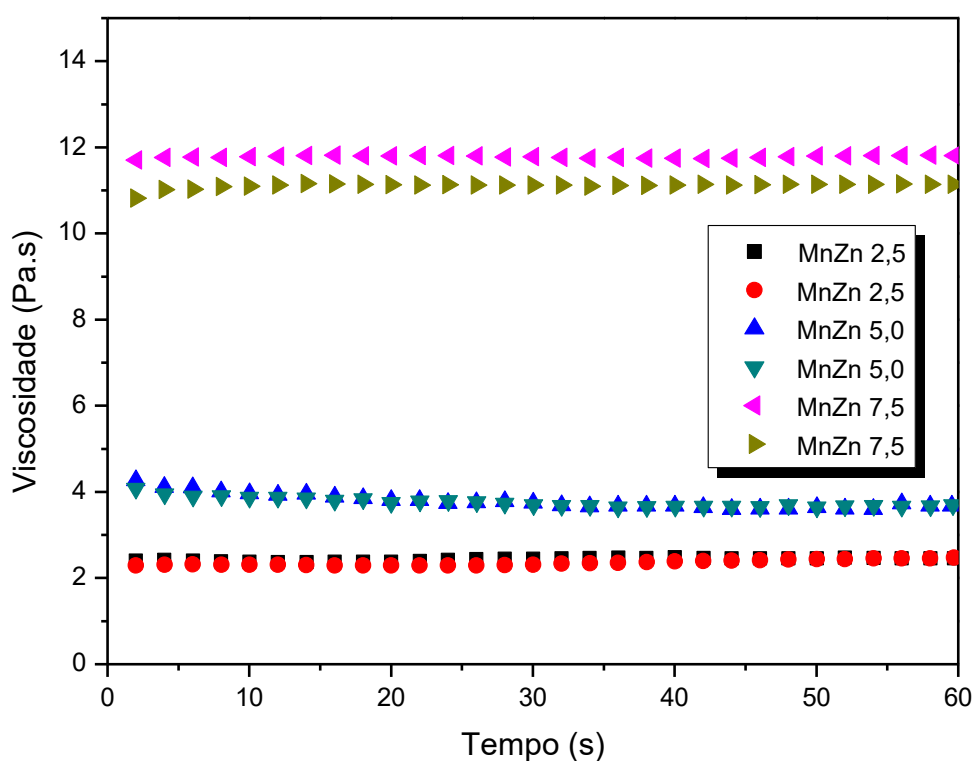


Fonte: Próprio Autor.

De acordo com os resultados obtidos, pode-se sugerir uma ordem geral de aumento da viscosidade dos coacervatos mistos (comparando a situação de maior participação do íon formador, no caso, os sistemas com nomenclatura 7,5):  $\text{CaCo} < \text{CaZn} < \text{CaCu}$ , para justificar a ordem obtida há uma relação direta entre a entalpia de hidratação e a posição dos íons não formadores na sequência apresentada. Quanto mais negativa for a entalpia de hidratação do íon não formador maior será a viscosidade do coacervato misto (para um mesmo íon formador). Vale ressaltar que a adição dos íons metálicos nos diferentes sistemas, ou seja, o par íon formador-íon não formador, foi realizada simultaneamente na solução de polifosfato de sódio.

A análise dos sistemas de zinco com os diferentes íons formadores também foi realizada, Mn/Zn (Figura 29) e Mg/Zn (Figura 30). Novamente, os coacervatos obtidos a partir dos sistemas em que a participação do íon formador era majoritária apresentaram maior viscosidade.

Figura 29. Curvas reológicas peak hold de fluxo contínuo dos coacervatos cloreto via coacervação mista MnZn

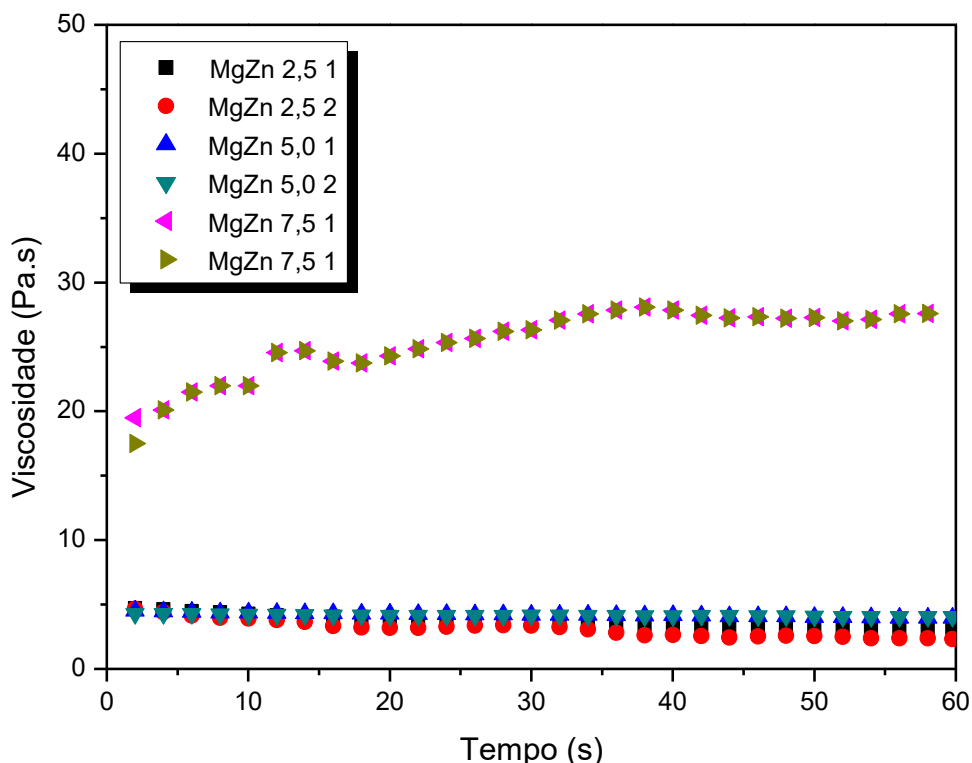


Fonte: Próprio Autor.

Ao comparar as viscosidades observadas de todos os coacervatos obtidos para os sistemas CaZn e MnZn se observa que os coacervatos correspondentes para o

sistema com cálcio demonstraram maior viscosidade, o que pode ser justificada pelo fato de o  $\text{Ca}^{2+}$  apresentar dentre os íons formadores o valor de entalpia de hidratação menos negativo.

Figura 30. Curvas reológicas peak hold de fluxo contínuo dos coacervatos cloreto via coacervação mista MgZn



Fonte: Próprio Autor.

Fazendo uma análise comparativa, sugere-se que uma ordem crescente na viscosidade das amostras  $\text{M}^{2+}_{\text{formador}}/\text{Zn}$ :  $\text{MnZn} < \text{MgZn} < \text{CaZn}$ , nesse caso houve uma inversão, entre os íons  $\text{Mn}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , na ordem de viscosidade esperada pela reologia dos íons formadores individualmente, pois o Mn havia demonstrado ser mais viscoso que o Mg. Essa inversão na ordem pode ser justificada pela entalpia de hidratação do íon  $\text{Mn}^{2+}$  ser menos negativa do que a do íon não formador, no caso, o  $\text{Zn}^{2+}$  que facilita a competição entre eles pelo sítios negativos da cadeia de polifosfato de sódio.

Os coacervatos obtidos foram ainda caracterizados por Espectroscopia Eletrônica na região do UV-Vis com o objetivo de quantificar os íons metálicos presentes no coacervato especificamente os íons  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ .

### 5.3.4 Espectroscopia Eletrônica na região do UV-Vis



Os íons  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  apresentam colorações intensas quando em solução aquosa devido às transições eletrônicas entre os orbitais d. Desta forma, tem-se a possibilidade de acompanhar, por Espectroscopia Eletrônica na região do UV-Vis, as bandas características das absorções de cada metal antes e após a coacervação.

A coordenação dos íons metálicos acarreta comumente uma diminuição da intensidade da banda ou ainda, um deslocamento no comprimento de onda de absorção da banda. De acordo com a literatura (SHRIVER, 1999; HUHEEY *et al.*, 1993), íons metálicos de configuração eletrônica  $d^9$  (no caso o íon  $\text{Cu}^{2+}$ ) apresentam duas bandas de absorção. Já íons com configuração  $d^7$  no caso do íon  $\text{Co}^{2+}$  apresenta três bandas de absorção, sendo a última de difícil detecção.

Pelo acompanhamento das bandas de absorção de cada íon metálico foi possível quantificar as espécies no sobrenadante, na região do UV-Vis, sendo que no caso de espectros com mais de uma banda visualizada foi escolhida para monitoramento a banda com maior intensidade, sem haver prejuízo para o estudo. Uma vez quantificado a espécie no sobrenadante, facilmente a espécie pode ser também quantificada no coacervato.

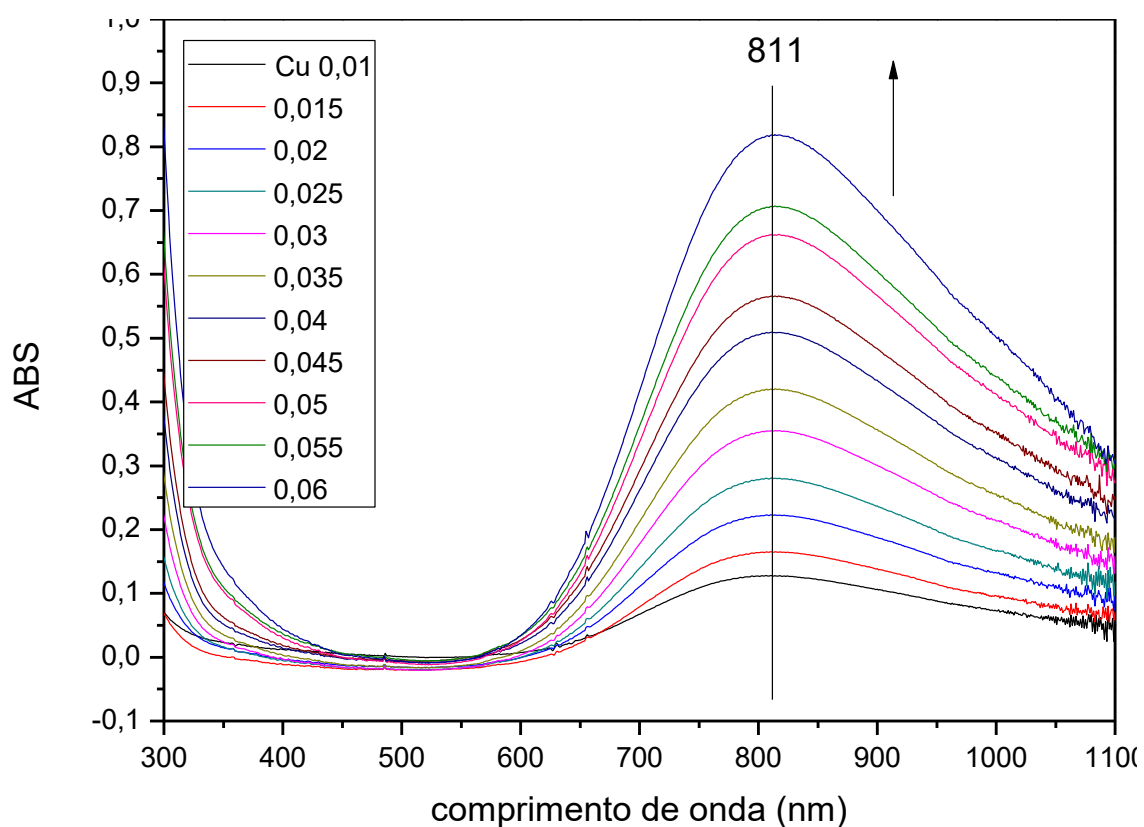
A princípio, foi necessário construir uma curva de calibração a fim de encontrar a absorvidade molar ( $\epsilon$ ) que é uma grandeza característica da espécie absorvente.

Inicialmente, foram preparadas soluções padrões dos íons metálicos para que fosse possível obter a curva de calibração. As concentrações foram baseadas nas limitações da Lei de *Lambert Beer* de absorbância máxima de 1,0. Após encontrar o valor da absorvidade molar pela curva de calibração, foram analisados os sobrenadantes de todos os sistemas, a fim de respeitar as limitações da Lei de *Lambert Beer* todos os sobrenadantes dos coacervatos de  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  foram diluídos, na razão de 0,1 mL de sobrenadante com 2 mL de água destilada em uma cubeta de quartzo e em seguida foi realizada a leitura.

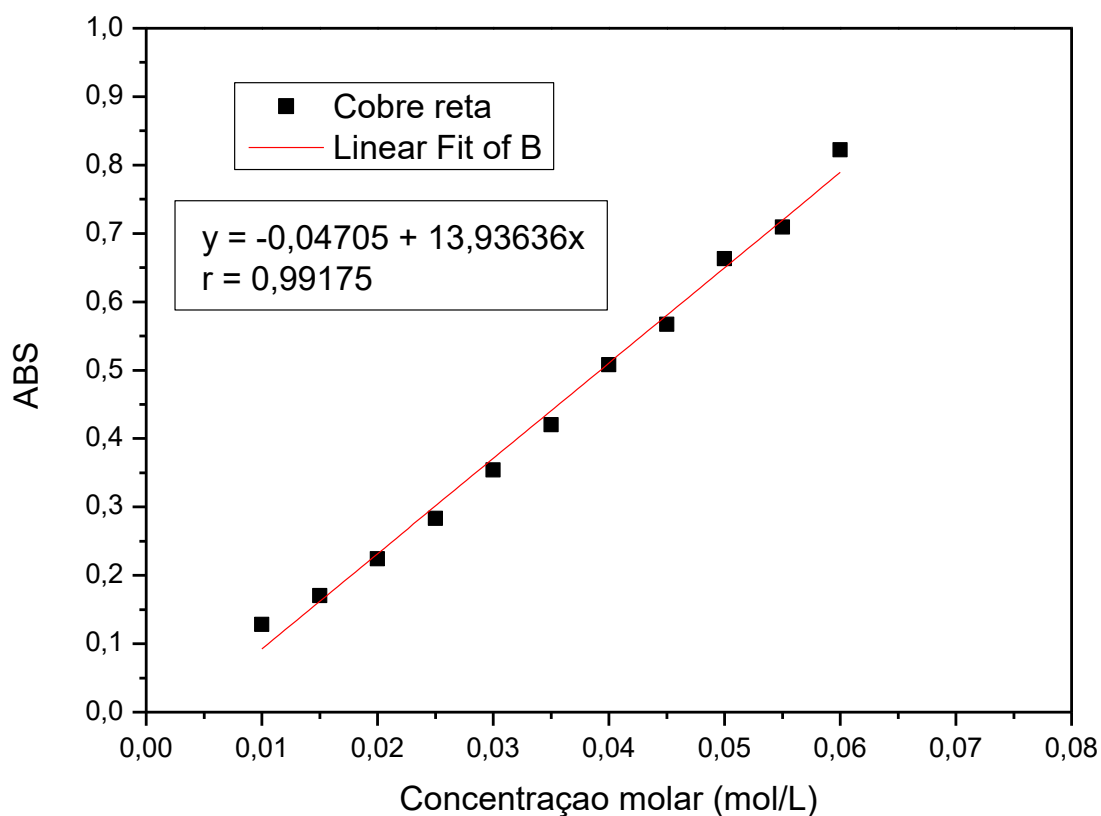
#### **5.3.4.1 Cobre**

A configuração eletrônica de  $\text{Cu}^{2+}$  é  $d^9$ , sendo previstos transições eletrônicas permitidas do tipo  ${}^2E_g \rightarrow {}^2B_{2g}$  mais intensa em torno de 811 nm e, a transição  ${}^2E_g \rightarrow {}^2B_{1g}$  menos intensa em torno de 470 nm com efeito de *Janh Teller* (RAHMOUNI *et al.*, 2014). Na figura 31, estão reunidos os espectros eletrônicos das soluções-padrão de  $\text{Cu}^{2+}$ . Com a respectiva curva de calibração (nas concentrações molares de 0,01; 0,015; 0,02; 0,025; 0,03; 0,035; 0,04; 0,045; 0,05; 0,055 e 0,06 mol.L<sup>-1</sup>), demonstrado na figura 34. A curva de calibração apresentou valores de absorvidade molar de 13,93636 e desvio de 0,99175 (Figura 32).

Figura 31. Espectros eletrônicos das soluções padrão de  $\text{Cu}^{2+}$



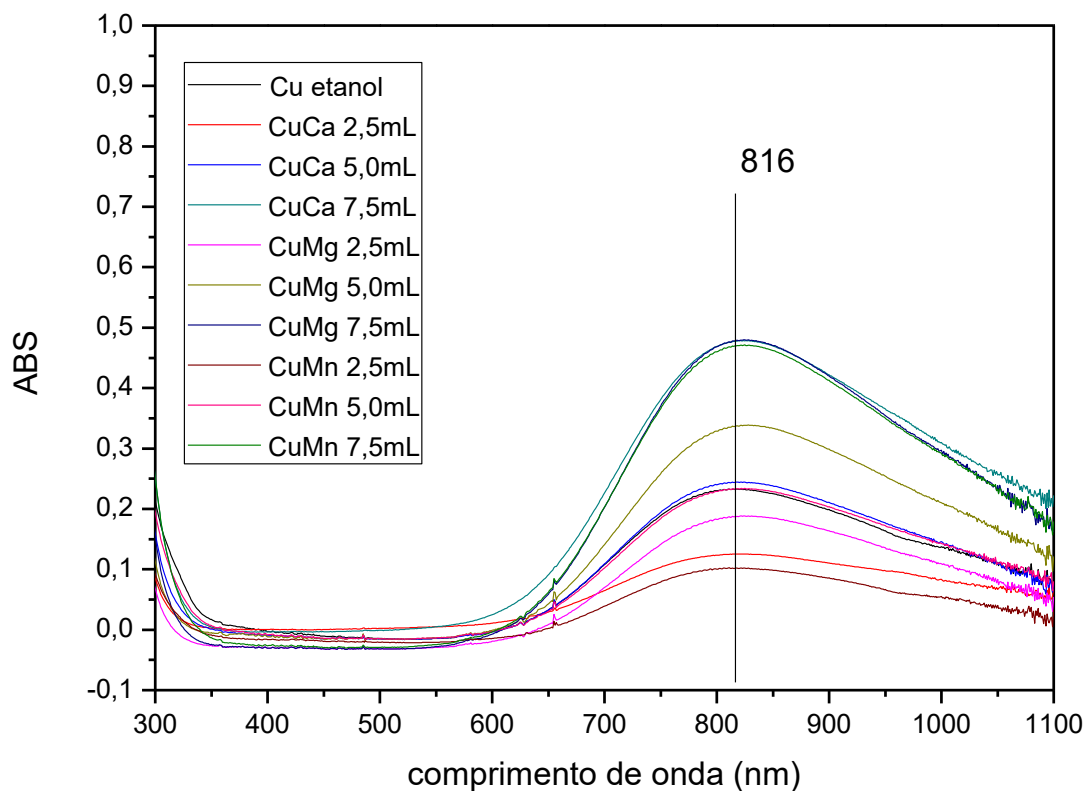
Fonte: Próprio Autor.

Figura 32. Curva de calibração das soluções padrão de  $\text{Cu}^{2+}$ 

Fonte: Próprio Autor.

O espectro eletrônico de todos os sobrenadantes com  $\text{Cu}^{2+}$  (figura 33) e os resultados da incorporação do  $\text{Cu}^{2+}$  estão reunidos na tabela 15. Pode-se concluir que a adição dos íons metálicos formadores viabilizou a interação de  $\text{Cu}^{2+}$  com a cadeia, porém a incorporação foi menor nos coacervatos mistos do que no coacervato simples, ou seja, na presença somente de  $\text{Cu}^{2+}$ , em virtude do menor raio iônico do cobre por comparação com os íons formadores –  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Mn}^{2+}$ .

Figura 33. Espectros eletrônicos dos sobrenadantes provenientes dos coacervatos mistos com  $\text{Cu}^{2+}$ .



Fonte: Próprio Autor.

Tabela 15. Resultados da quantificação do  $\text{Cu}^{2+}$  nos diferentes coacervatos.

Sistemas	% sobrenadante	% coacervato
Cu etanol	36,71	63,29
CuCa 2,5mL	66,52	33,48
CuCa 5,0mL	64,98	35,02
CuCa 7,5mL	86,79	13,21
CuMg 2,5mL	100,00	0,00
CuMg 5,0mL	100,00	0,00
CuMg 7,5mL	100,00	0,00
CuMn 2,5mL	50,72	49,28
CuMn 5,0mL	61,53	38,47
CuMn 7,5mL	100,00	0,00

Fonte: Dados da pesquisa.

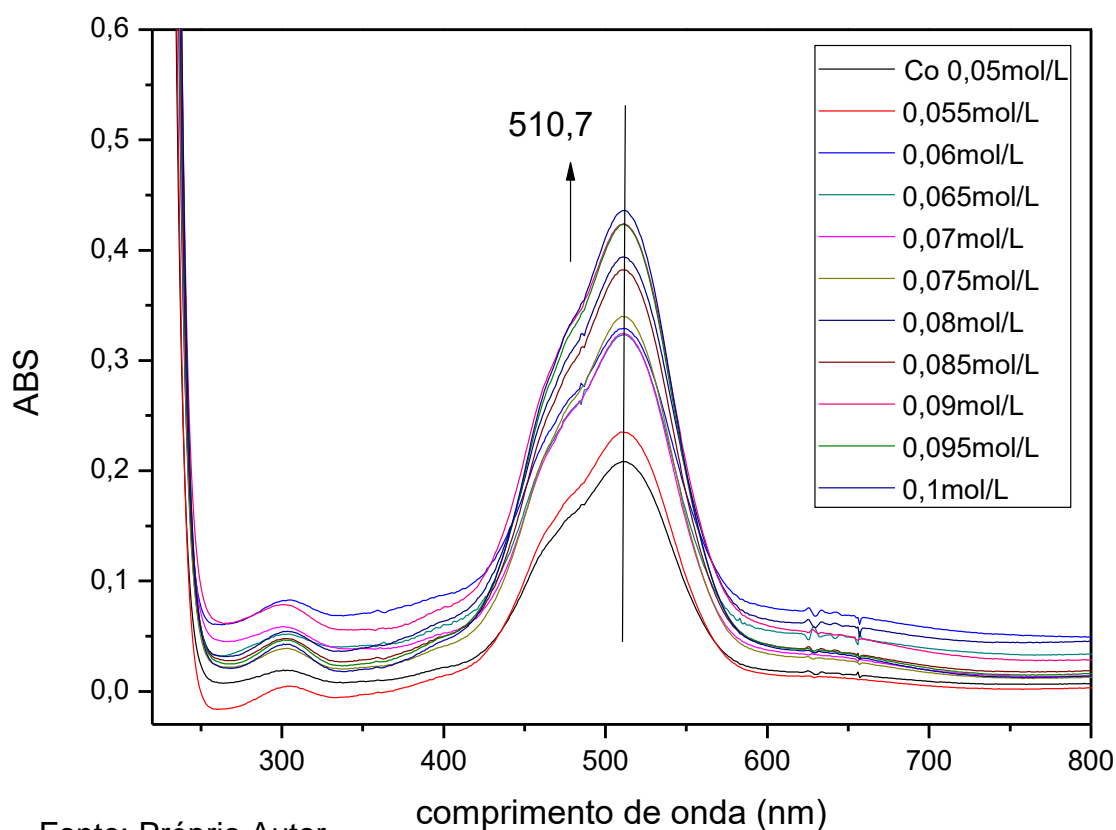
Vale ressaltar que a nomenclatura que discrimina a participação de cada íon nesse caso é diferente, o volume representado é o volume do primeiro íon citado, no caso o  $\text{Cu}^{2+}$  e a porcentagem  $\text{Cu}^{2+}$  presente no sobrenadante foi utilizada indiretamente para determinar a porcentagem de  $\text{Cu}^{2+}$  incorporado no coacervato, esse percentual é em número de mols.

### 5.3.4.2 Cobalto

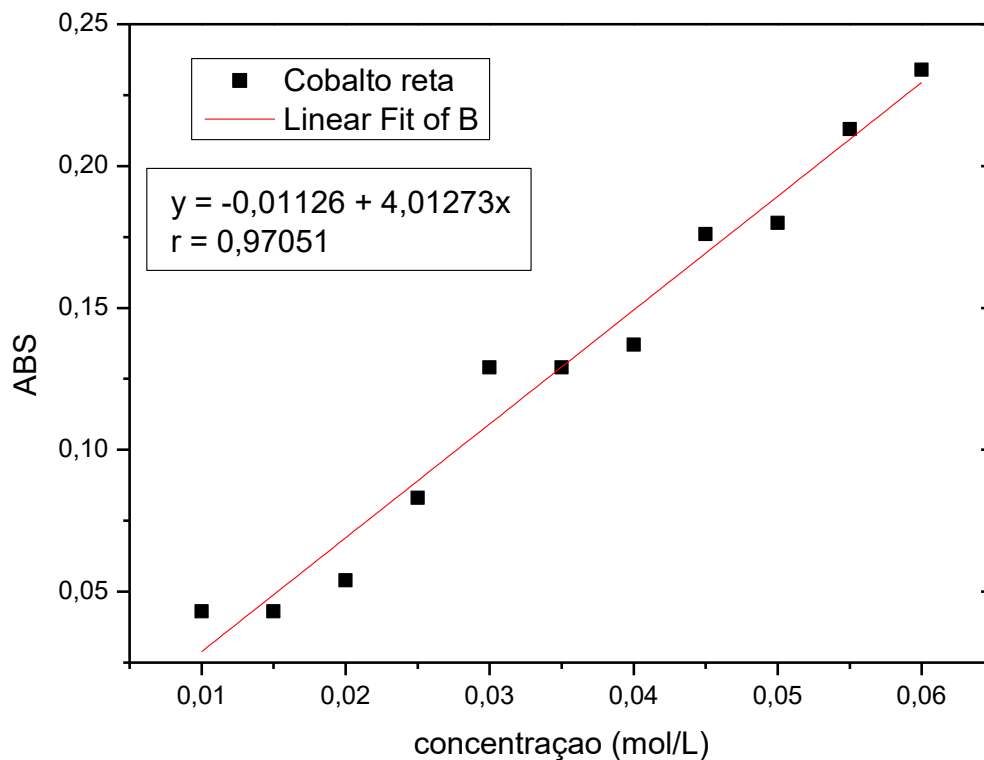
O íon metálico  $\text{Co}^{2+}$  apresenta configuração eletrônica  $d^7$  onde as transições permitidas para um complexo octaédrico, são:  ${}^2E_g \rightarrow {}^2T_{1g}$  em torno de 510 nm,  ${}^2E_g \rightarrow {}^2T_{2g}$  em torno de 300 nm e  ${}^2E_g \rightarrow {}^2A_1$  não visualizada no espectro, de baixo spin (bandas d-d aquo em todos os casos).

As concentrações de soluções-padrão utilizadas para o  $\text{Co}^{2+}$  foram: 0,05; 0,055; 0,06; 0,065; 0,07; 0,075; 0,08; 0,085; 0,09; 0,095 e 0,1 mol.L<sup>-1</sup> (Figura 34), com curva de calibração composta por 11 pontos (Figura 35), absorvidade molar de 4,01273 e desvio de 0,97051.

Figura 34. Espectros eletrônicos das soluções padrão de  $\text{Co}^{2+}$



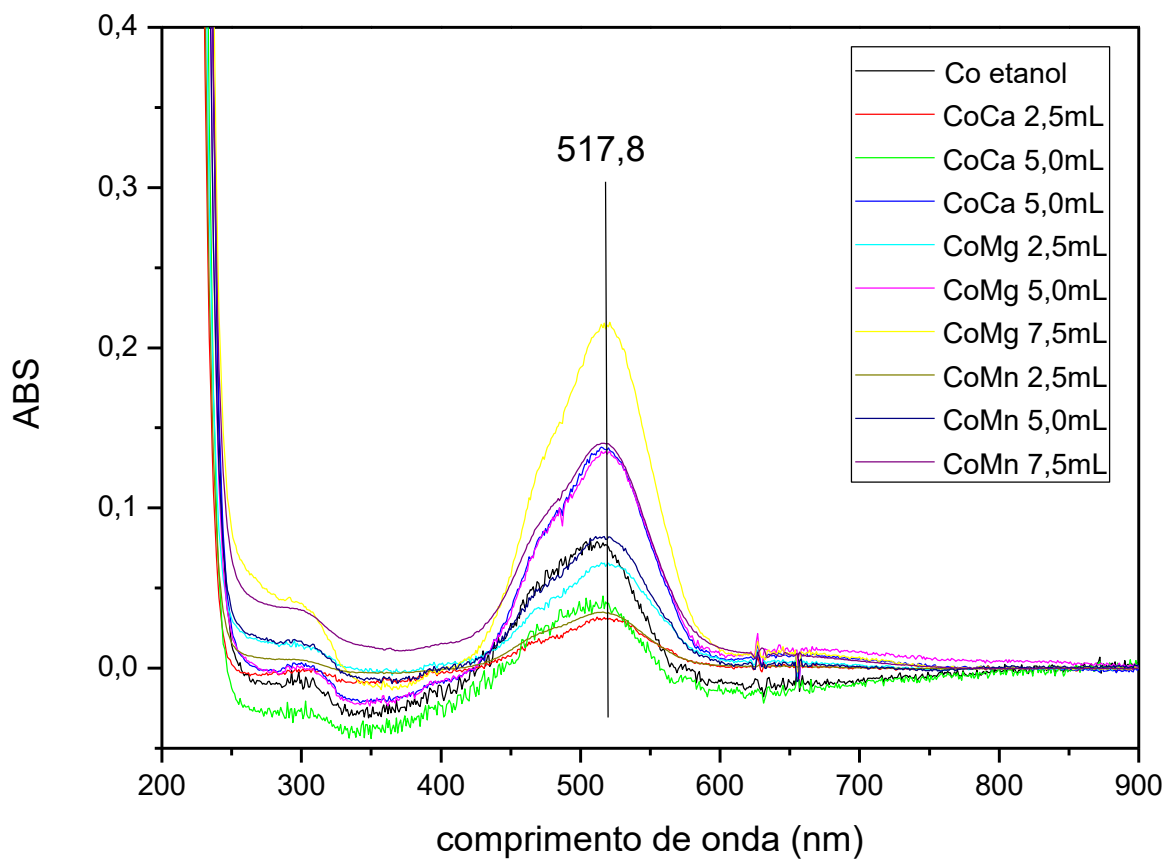
Fonte: Próprio Autor.

Figura 35. Curva de calibração das soluções padrão de  $\text{Co}^{2+}$ 

Fonte: Próprio Autor.

Os espectros eletrônicos com todos os sobrenadantes oriundos dos coacervatos com  $\text{Co}^{2+}$  são mostrados na figura 36 e os resultados da incorporação do  $\text{Co}^{2+}$  nos coacervatos estão reunidos na tabela 16. Por apresentar um raio iônico maior que o outro íon estudado,  $\text{Cu}^{2+}$ , a incorporação de cobalto na cadeia foi mais efetiva e ainda por ser menos impedido devido a menor interação com as moléculas de água dado o valor de entalpia de hidratação menos negativo.

Figura 36. Espectros eletrônicos dos sobrenadantes provenientes de coacervação mista com  $\text{Co}^{2+}$



Fonte: Próprio Autor.

Tabela 16. Resultados da quantificação do  $\text{Co}^{2+}$  nos diferentes coacervatos

<b>Sistemas</b>	<b>% sobrenadante</b>	<b>% coacervato</b>
<b>Co etanol</b>	40,36	59,64
<b>CoCa</b> <b>2,5mL</b>	54,01	45,99
<b>CoCa</b> <b>5,0mL</b>	35,15	64,85
<b>CoCa</b> <b>7,5mL</b>	84,32	15,68
<b>CoMg</b> <b>2,5mL</b>	93,20	6,80
<b>CoMg</b> <b>5,0mL</b>	85,09	14,91
<b>CoMg</b> <b>7,5mL</b>	100,00	0,00
<b>CoMn</b> <b>2,5mL</b>	95,08	4,92
<b>CoMn</b> <b>5,0mL</b>	79,39	20,61
<b>CoMn</b> <b>7,5mL</b>	88,19	11,81

Fonte: Dados da pesquisa.

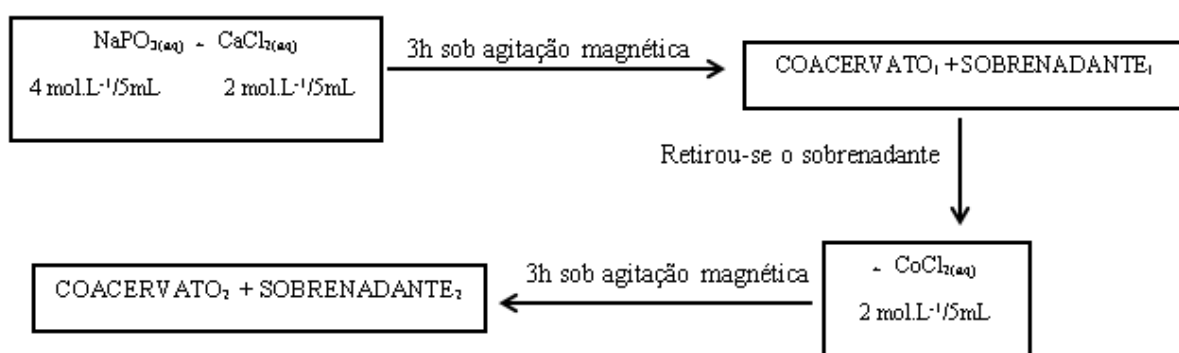
Em suma, os resultados de incorporação com íons metálicos combinados sugerem que quanto mais próximo for o raio iônico do íon metálico que forma coacervato naturalmente (ou seja, do íon formador de coacervato) do outro íon metálico menor será a incorporação desse último o que indica que ocorre uma competição pelos sítios de ligação na cadeia do polifosfato.

Nesse sentido, foi avaliado a possibilidade de troca iônica no coacervato, principalmente utilizando soluções em que originalmente são coloridas, como é o caso das soluções de cloretos de  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$ . Observou-se que ao formar coacervatos a



partir de soluções de metais divalentes coloridos, o coacervato incorporava a cor como também o sobrenadante mantinha a cor inicial da solução salina indicando que ainda existiam espécies no meio. Ou seja, o sistema nos fornece dois indicativos visuais, o sobrenadante contém íon não formador que não interagiu com a matriz de polifosfato de sódio assim como o coacervato incorporou os referidos metais diante da coloração apresentada. A fim de avaliarmos a possibilidade de troca iônica, foi realizado o experimento descrito no esquema da figura 37.

Figura 37. Fluxograma da incorporação do  $\text{Co}^{2+}$  diretamente no coacervato a partir de  $\text{NaPO}_3$  e  $\text{CaCl}_2$



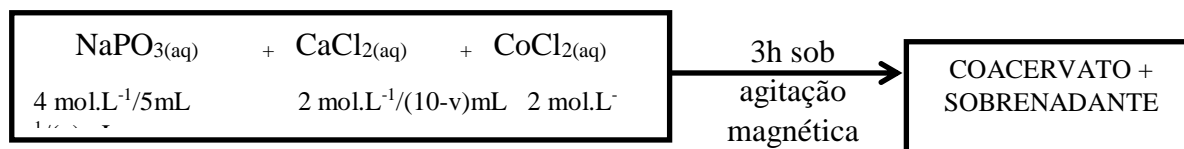
Fonte: Próprio Autor.

A relação molar da mistura de polifosfato de sódio e  $\text{Ca}^{2+}/\text{Co}^{2+}$  foi a mesma utilizada durante todo o trabalho de 2:1, inicialmente o coacervato formado teve apenas contribuição do  $\text{Ca}^{2+}$ , com a substituição do sobrenadante 1 por uma solução de  $\text{Co}^{2+}$  houve uma troca entre os íons evidenciada visualmente pela incorporação da cor rosa do coacervato 2.

Entende-se o papel decisivo de  $\text{Ca}^{2+}$  na formação do coacervato, visto que o tempo de agitação para o sistema contendo  $\text{NaPO}_3$  e  $\text{CoCl}_2$  nunca seria suficiente para garantir a formação do coacervato, porém presença de  $\text{Ca}^{2+}$  no meio força o início da coacervação instantaneamente.

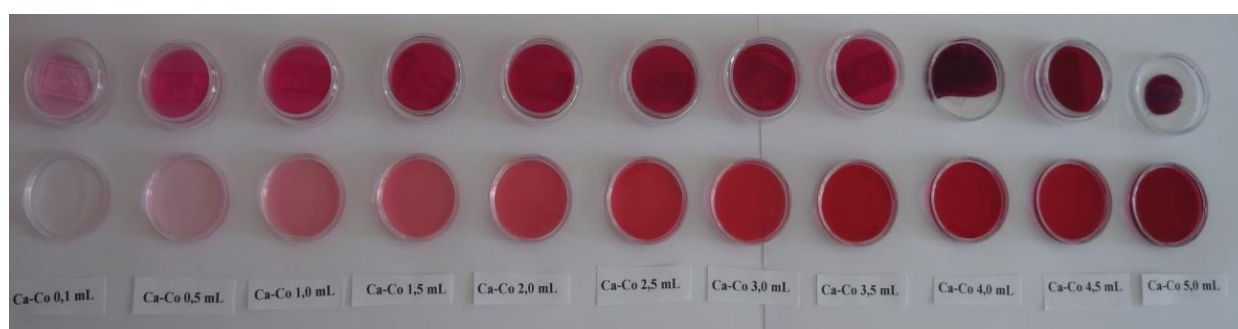
Para fins didáticos, foi repetido um estudo semelhante ao esquema representado na figura 38, os resultados foram registrados através de fotos mostradas na figura 39. Foram misturados  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  em volumes distintos e ao mesmo tempo complementares a fim de garantir um volume final fixo de 5mL de solução salina mista e 5 mL de  $\text{NaPO}_3$ .

Figura 38. Esquema ilustrativo para teste visual de incorporação de  $\text{Co}^{2+}$  no coacervato a partir de  $\text{NaPO}_3$  e  $\text{CaCl}_2$ .



Fonte: Próprio Autor.

Figura 39. Foto dos sobrenadantes (na parte inferior) e dos coacervatos (na parte superior) obtidos por coacervação mista com  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Co}^{2+}$



Fonte: Próprio Autor.

Todos os sistemas apresentavam um volume final de 10,0 mL como mencionado anteriormente, porém a nomenclatura demonstrada na foto da figura 43 pode ser explicada da seguinte forma: os sistemas foram formados pela participação de 5,0 mL do grupo misto CaCo e 5,0 mL de polifosfato de sódio, dessa forma a solução colorida de  $\text{Co}^{2+}$  foi adicionado nas razões de 0,1 mL (portanto 4,9 mL de  $\text{Ca}^{2+}$ ) até a adição de 5,0 mL de  $\text{Co}^{2+}$  (nesse caso 0,0 mL de  $\text{Ca}^{2+}$ ), com a necessidade de adição de álcool etílico nesse caso.

Observou-se a coloração em uma escala crescente da esquerda para a direita conforme aumenta a concentração de  $\text{Co}^{2+}$  no meio, tanto no sobrenadante como no coacervato.

## **CAPÍTULO 2 INTERAÇÃO POLIFOSFATO DE SÓDIO E QUITOSANA**

#### 5.4 Interação polifosfato - quitosana

É sabido que a mistura de polieletrólitos de cargas opostas gera a formação de duas fases em condições isoeletricas, o produto gerado é chamado de complexo ou coacervato. A separação de fases a nível macroscópico pode ser entendida como uma consequência do ganho de entropia ocasionado pela liberação do contra íons (KIZILAY, 2011).

A complexação entre macromoléculas pode levar a uma variedade de materiais com estruturas e propriedades distintas, pode-se então conduzir a formação de microesferas, coacervatos, membranas, fibras dentre outras. No presente trabalho, a variável reacional que mostrou ser crucial para a previsão do produto final foi a ordem de adição dos reagentes de partida – no caso, a quitosana e o polifosfato de sódio.

As vesículas ou microesferas de quitosana representam atualmente os sistemas de administração de medicamentos mais estudados por viabilizar uma liberação controlada de drogas. É sabido que tecnologias de microencapsulação podem proporcionar um aumento do tempo de vida dos componentes ativos e ao mesmo tempo controla a liberação de agentes bioativos presentes nas drogas (GUPTA, 2013).

As variáveis reacionais estudadas para um sistema otimizado com microesferas estáveis foram: a) Concentração do ácido acético na etapa de solubilização da quitosana, b) Razão molar  $\text{NaPO}_3$ /Quitosana e c) Ordem de adição dos reagentes. As quitosanas utilizadas nos diferentes estudos estão reunidas na tabela 17.

Tabela 17. Valores de GD teórico e real das amostras de quitosanas utilizadas

Amostra de quitosana	GD teórico	GD real
Polymar 1023	<b>92%</b>	<b>97,63%</b>
Polymar 1029	<b>84%</b>	-
Aldrich	<b>75-85%</b>	<b>77,75%</b>

\*GD = Grau de desacetilação

Fonte: dados da pesquisa

A partir de então sempre que houver menção a quitosana de procedência polymer, essa fará uma referência ao lote 1023. A amostra de quitosana mais indicada para formação das microesferas foi a de procedência sigma-aldrich. Após o período final pós-solubilização de duas horas todas as amostras de quitosana polymer foram submetidas a filtração a vácuo utilizando um funil de *Bunche* de 90 mm de diâmetro.

#### **5.4.1 Concentração do ácido acético na etapa de solubilização**

As quitosanas utilizadas foram solubilizadas em meio ácido, com diferentes concentrações de ácido acético (1, 5 e 10%, v:v em água destilada). A solubilização da quitosana em meio ácido foi testada em 2, 12 e 24 horas. O tempo demonstrou ser decisivo conforme a concentração de ácido acético utilizada na solubilização da quitosana, em soluções de ácido acético 1% foi necessário um tempo de 24 horas para obter uma solução. Todas as soluções utilizadas na preparação das microesferas têm caráter ácido, nas diferentes concentrações testadas, o que corrobora a estabilidade da quitosana no meio pois essa só é solúvel e carregada em meio ácido, conforme mostra a tabela 18.

Vale ressaltar que todos os valores de pH das soluções de partida demonstraram ser de levemente a moderadamente ácidas o que favorece, por exemplo, à solubilização da quitosana e ao mesmo tempo à interação eletrostática entre as cadeias dos políons pela geração de cargas positivas ao longo da cadeia polimérica da quitosana.

Tabela 18. Valores de pH das soluções utilizadas na formação das esferas

<b>Solução</b>	<b>pH</b>
<b>NaPO<sub>3</sub> 0,002 mol.L<sup>-1</sup></b>	6,75
<b>NaPO<sub>3</sub> 0,02 mol.L<sup>-1</sup></b>	5,77
<b>NaPO<sub>3</sub> 0,2 mol.L<sup>-1</sup></b>	5,75
<b>NaPO<sub>3</sub> 4 mol.L<sup>-1</sup></b>	5,12
<b>Solução de quitosana polymar em HAc 10%</b>	3,60
<b>Sobrenadante pós-formação de microesferas (polymar)</b>	3,18
<b>Solução de quitosana aldrich em HAc 1%</b>	4,34
<b>Sobrenadante pós-formação de microesferas (aldrich)</b>	4,04
<b>Ácido acético 1%</b>	3,47
<b>Ácido acético 5%</b>	3,20
<b>Ácido acético 10%</b>	3,07

Fonte: dados da pesquisa

Com a finalidade de estudar o efeito do volume no sistema Quitosana/NaPO<sub>3</sub>, a quitosana de procedência polymar foi solubilizada diretamente em uma solução de polifosfato 0,2 mol.L<sup>-1</sup> previamente acidificada (foi necessário um volume de 5,0 mL de ácido acético concentrado para obtermos um pH 3,08 - equivalente ao pH da solução de ácido acético 10%). A quitosana foi solubilizada, porém não foi observado nenhum produto final resultante da mistura dos dois polieletrólitos.

A condição otimizada para esse teste de solubilização de quitosana foi de concentração de HAc 10% para a amostra polymar (condição que gerou um sistema mais viscoso e mais homogêneo no mesmo tempo de agitação magnética, 2 horas) e HAc 1% para a amostra da aldrich, pois essa quitosana demonstrou viscosidades elevadas em HAc 5 e 10% para gotejamento. Em suma, a solubilidade foi melhor para HAc 10% para a polymar e HAc 1% para aldrich.

#### 5.4.2 Razão molar NaPO<sub>3</sub>/Quitosana

Como condição para a formação do produto de interesse foi avaliada a relação existente entre os graus de polimerização dos poliíons utilizados uma vez que a coacervação pode ser entendida como sendo uma consequência do pareamento de cargas opostas. Logo, percebeu-se que o polifosfato deveria ter maior contribuição nos sistemas em termos de concentração molar devido ao baixo grau de polimerização do mesmo, foram testadas três razões molares distintas para Polifosfato/Quitosana de 1000, 100 e 10 (utilizando para esses testes a quitosana polimar), os resultados obtidos nos testes estão reunidos nas tabelas 19 e 20 que caracterizam as razões de 1000:1 e 100:1, respectivamente. A razão molar de 10:1 não será discutida pois não houve formação de produtos.

Vale ressaltar que a nomenclatura presente nas tabelas quit-poli e poli-quit refletem a sequência de adição dos polímeros, em poli-quit a solução de polifosfato foi adicionada, por gotejamento, à solução de quitosana o que se espera gerar um coacervato. Já a sequência quit-poli sinaliza que a solução de quitosana foi adicionada, por gotejamento, à solução de polifosfato de sódio o que se espera produzir microesferas.

Tabela 19. Dados experimentais para os sistemas com razão molar polifosfato/quitosana igual a 1000:1

<b>Sistema</b>	<b>Quitosana</b>	<b>Razão v:v Ác. Acético/H<sub>2</sub>O</b>	<b>V<sub>sobrenadante</sub></b>	<b>pH<sub>sobrenadante</sub></b>
<b>Quit-Poli</b>	1023	1%	7,3mL	4,351
<b>Poli-Quit</b>	1023	1%	6,4mL	4,259
<b>Quit-Poli</b>	1029	1%	8,8mL	4,609
<b>Poli-Quit</b>	1029	1%	8,4mL	4,564
<b>Quit-Poli</b>	1023	5%	8,0mL	3,729
<b>Poli-Quit</b>	1023	5%	6,6mL	3,656
<b>Quit-Poli</b>	1029	5%	7,7mL	3,643
<b>Poli-Quit</b>	1029	5%	8,2mL	3,656
<b>Quit-Poli</b>	1023	10%	7,5mL	3,391
<b>Poli-Quit</b>	1023	10%	7,9mL	3,363
<b>Quit-Poli</b>	1029	10%	7,8mL	3,033
<b>Poli-Quit</b>	1029	10%	7,3mL	3,312

Fonte: dados da pesquisa

Tabela 20. Dados experimentais para os sistemas com razão molar polifosfato/quitosana igual a 100:1

<b>Sistema</b>	<b>Quitosana</b>	<b>Razão v:v Ác. Acético/H<sub>2</sub>O</b>	<b>pH<sub>sobrenadante</sub></b>
<b>Quit-Poli</b>	1023	1%	4,247
<b>Poli-Quit</b>	1023	1%	4,239
<b>Quit-Poli</b>	1029	1%	4,243
<b>Poli-Quit</b>	1029	1%	4,241
<b>Quit-Poli</b>	1023	5%	3,373
<b>Poli-Quit</b>	1023	5%	3,503
<b>Quit-Poli</b>	1029	5%	3,375
<b>Poli-Quit</b>	1029	5%	3,477
<b>Quit-Poli</b>	1023	10%	3,038
<b>Poli-Quit</b>	1023	10%	3,025
<b>Quit-Poli</b>	1029	10%	3,021



<b>Poli-Quit</b>	1029	10%	3,015
------------------	------	-----	-------

Fonte: dados da pesquisa

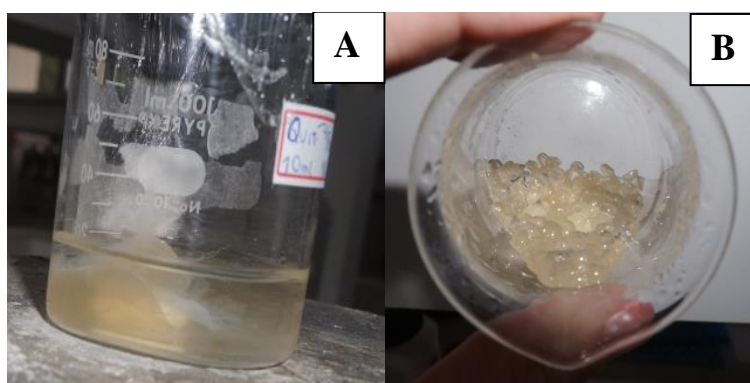
Vale ressaltar que na tabela 20 não foi apresentado os volumes dos respectivos coacervatos, microesferas e dos sobrenadantes em virtude dos produtos formados apresentarem instabilidade na forma que inviabilizou a separação nos diferentes sistemas.

Foram realizados ainda testes preliminares para os sistemas com razão molar Polifosfato/Quitossana intermediário de 50:1, porém não houve formação de coacervato ou microesferas. Em termos de estabilidade das microesferas no meio a razão molar de 1000:1 demonstrou ser a razão otimizada

#### 5.4.3 Ordem de adição dos reagentes

A ordem de adição dos polieletrólitos demonstrou ser uma variável reacional crucial para a reação de coacervação complexa entre esses dois polieletrólitos, pois dependendo da ordem de adição se tem a previsibilidade do produto formado e com isso possibilidade da previsão das propriedades e aplicações (figura 40).

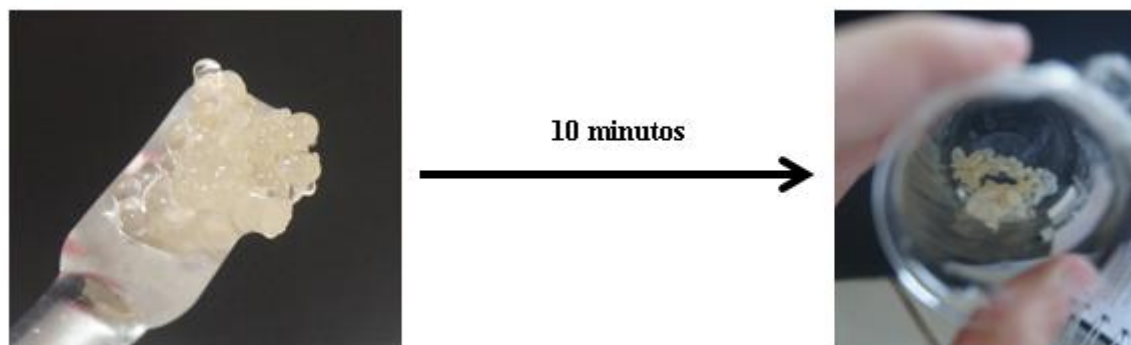
Figura 40. Foto representando em A (sequência poli-quit) o gel e B (sequência quit-poli) as microesferas



Fonte: Próprio autor.

Conforme a literatura reporta (SINHA *et al.*, 2004) as microesferas de quitossana são instáveis em meio ácido e rompem rapidamente nesse meio, em torno de 10 min após a separação do sobrenadante e sem lavagem, observação comprovada em todos os experimentos testados (Figura 41).

Figura 41. Foto representando as microesferas no momento em que se formam à esquerda e após 10 minutos da separação com o sobrenadante, foto à direita



Fonte: Próprio autor.

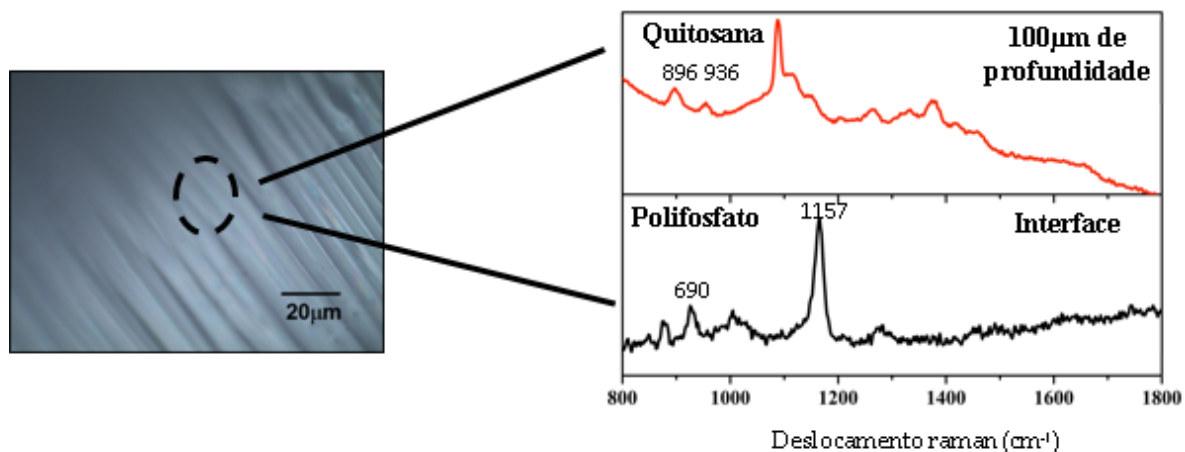
A explicação para a instabilidade das microesferas está relacionada com a síntese em meio ácido, pois o excesso de prótons favorece um deslocamento no equilíbrio para a solubilização da quitosana e sendo assim, as vesículas ou microesferas rompem para se solubilizarem.

Dos produtos formados, as microesferas têm destaque em virtude das inúmeras aplicações que podem ser propostas. Logo, somente as microesferas foram caracterizadas por I) RAMAN confocal, II) espectroscopia vibracional na região do infravermelho e III) análise termogravimétrica.

#### 5.4.4 RAMAN confocal

A espectroscopia vibracional RAMAN confocal (Figura 42) evidenciou que a superfície é composta majoritariamente de polifosfato (porção inorgânica), caracterizado através das vibrações P-O-P e os  $PO_2$ , que ocorrem em torno de 690 e cerca de  $1157\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente (MAJED, 2010). Embora o espectro da quitosana apresenta semelhança ao espectro do polifosfato, é possível diferenciá-los. O perfil espectral apresentado pelo interior da microesfera sugeriu a quitosana (porção orgânica) como componente principal porque os picos de  $896$  e  $936\text{ cm}^{-1}$  caracterizam as vibrações de deformação C-H e o alongamento C-N, respectivamente.

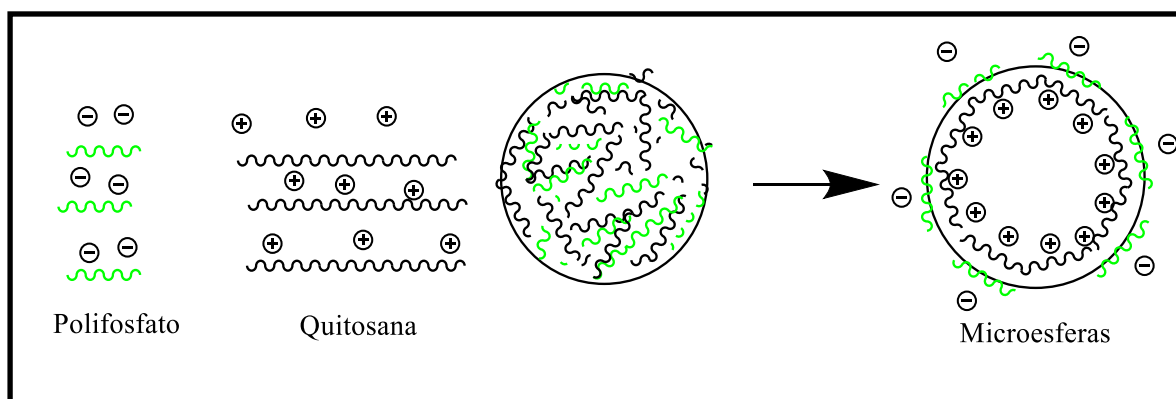
Figura 42. Espectro Raman confocal das microesferas produzidas a partir de quitosana e polifosfato de sódio



Fonte: Próprio Autor.

Essa técnica permitiu confirmar a natureza híbrida da microesfera e elucidar a organização estrutural da microesfera formada, conforme ilustra a figura 43.

Figura 43. Figura ilustrativa que sugere a organização estrutural da microesfera



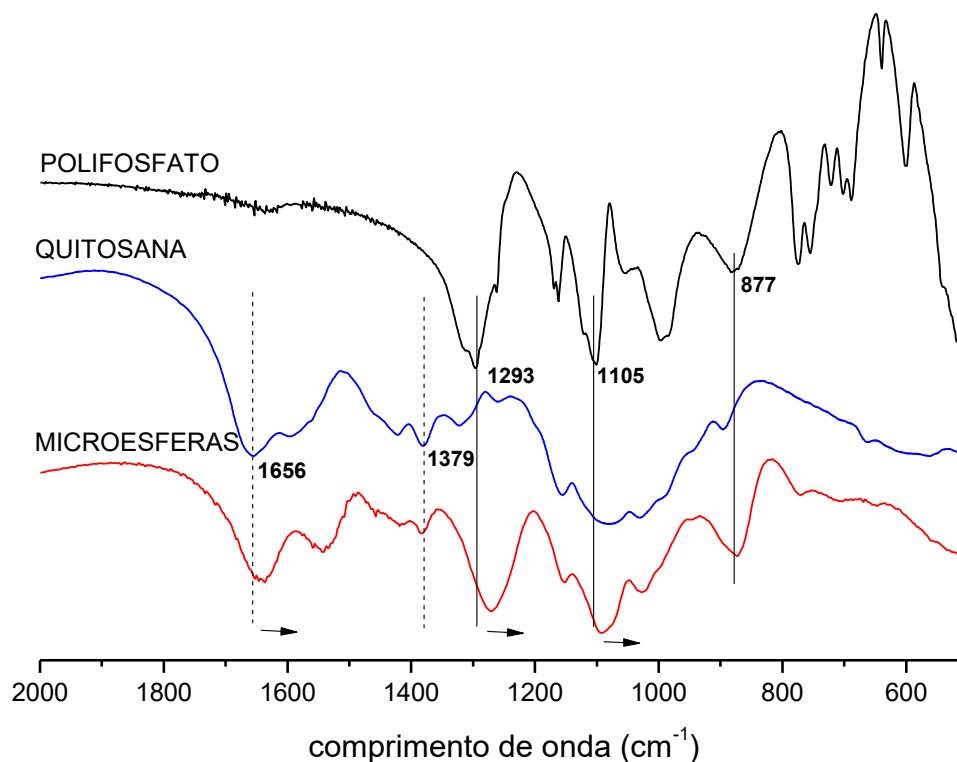
Fonte: Próprio Autor.

#### 5.4.5 Espectroscopia vibracional na região do infravermelho

A Espectroscopia vibracional na região do infravermelho sugere a contribuição dos precursores na formação das microesferas. As posições das bandas que caracterizam o meio da cadeia polimérica e dos átomos terminais do polifosfato sofreram deslocamento (são elas:  $\nu_s(\text{P-O-P})$ ,  $\nu_s(\text{PO}_3 \text{ terminal})$  e  $\nu_{as}(\text{PO}_2^- \text{ meio da cadeia})$  em 877, 1105 e 1293,  $\text{cm}^{-1}$  respectivamente) como mostra a figura 44. O

deslocamento dessas bandas sugere que os sítios negativos do meio da cadeia e terminais foram envolvidos na interação com a cadeia catiônica da quitosana.

Figura 44. Espectro vibracional dos precursores, polifosfato de sódio e quitosana e, das microesferas formadas a partir desses polímeros



Fonte: Próprio Autor.

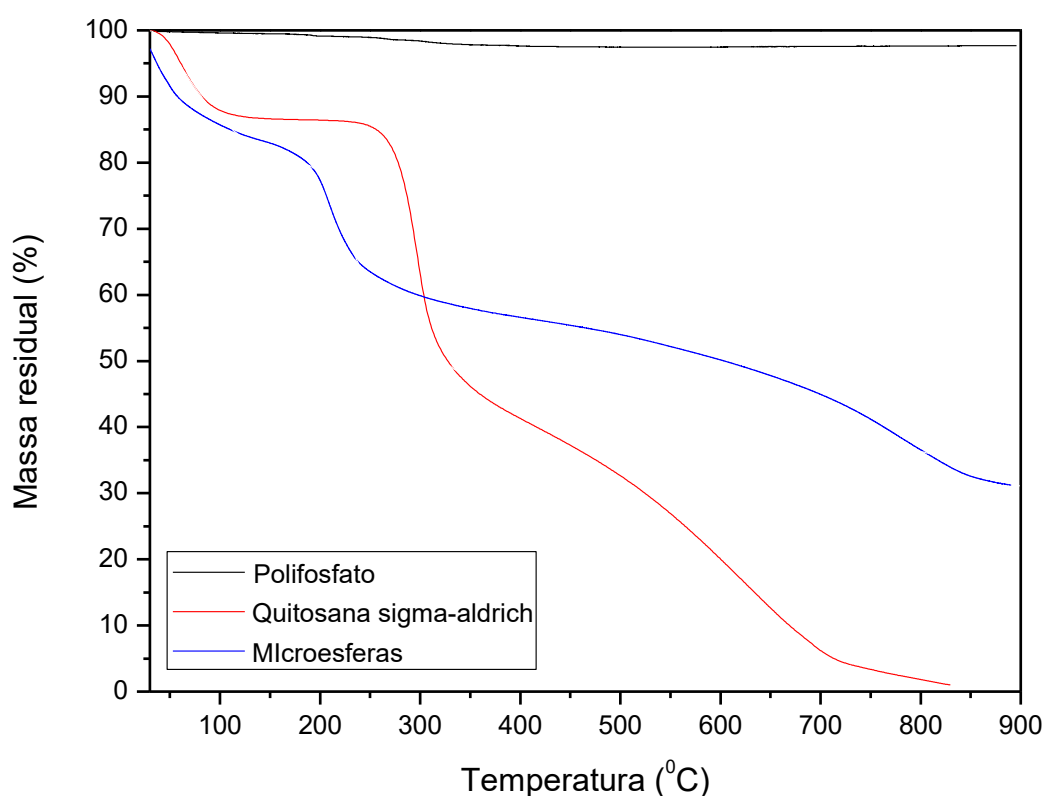
As microesferas apresentaram modos vibracionais característicos da estruturas de quitosana e também do polifosfato de sódio. Comparativamente ao espectro da quitosana, observou-se a banda referente a deformação axial de C=O de amida em 1656  $\text{cm}^{-1}$  e uma banda referente a deformação angular de C-H do grupo  $\text{CH}_3$  em 1379  $\text{cm}^{-1}$ , além de bandas de estruturas polissacarídicas na região de 1028 - 1153  $\text{cm}^{-1}$  (região comprometida por pertencer a identidade dos dois polímeros).

#### 5.4.6 Análise termogravimétrica

As amostras dos precursores, quitosana de procedência sigma-aldrich (mais indicada para a preparação de microesferas) e polifosfato de sódio foram aquecidas em um intervalo de 30 a 900°C a fim de fornecer um indicativo da constituição das

microesferas pela perda de massa apresentada, conforme mostra a figura 45. Como esperado, o polifosfato não demonstrou uma perda de massa significativa, com massa residual de 97,7% por se tratar de um composto inorgânico. A massa residual de quitosana foi de 7,8% e conforme já sugerido pelas análises nos modos vibracionais e pela espectroscopia raman, a análise termogravimétrica também sugere a presença dos dois polímeros na constituição das microesferas, evidenciado pela massa residual da amostra intermediária aos valores dos precursores, de 31,3%.

Figura 45. TG dos precursores e da amostra de microesferas formada



Fonte: Próprio autor.

### 5.5 Aplicação das microesferas - Imobilização de proteínas e enzimas

As microesferas apresentam inúmeras aplicações incluindo a imobilização de proteínas e enzimas, assim como mecanismos de formação variados, cada um deles apresenta vantagens e desvantagens. A imobilização de proteínas e enzimas em microesferas formadas a partir da interação dos polímeros de quitosana e polifosfato pode evidenciar um novo suporte promissor. Esses polímeros apresentam a vantagem de serem totalmente biodegradáveis e atóxicos, possuindo aplicações inclusive na

indústria de alimentos e bebidas. O catalisador (a enzima) imobilizado nesse sistema é muito atrativo do ponto de vista industrial por se tratar de um sistema biodegradável, ou seja, que não geraria resíduos e por ter demonstrado seletividade elevada não levaria a formação de subprodutos indesejáveis e dispensaria etapas posteriores de purificação.

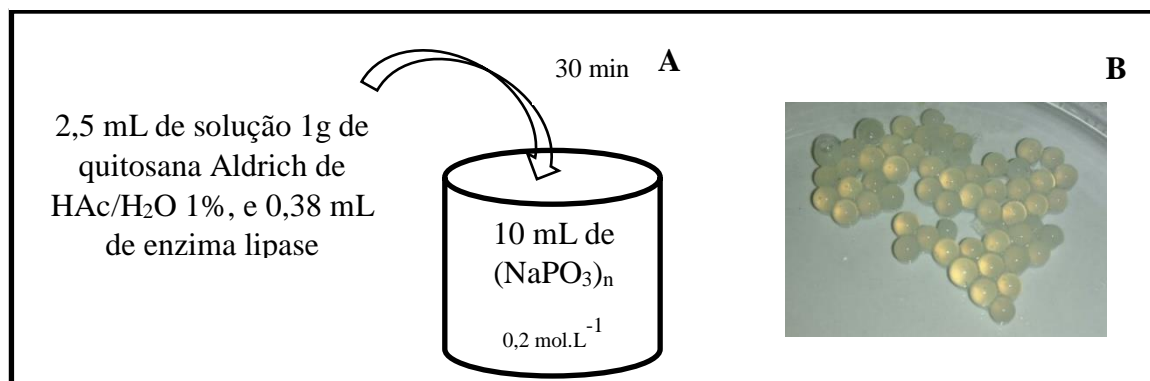
A proteína testada para otimização dos parâmetros de imobilização foi a albumina bovina e a quantidade escolhida para ser imobilizada foi de 50 mg, com concentração final de 1mg/mL. A fim de avaliar a eficiência da microencapsulação da proteína albumina em função da sequência de adição de albumina ao sistema contendo polifosfato de sódio e quitosana três possibilidades foram avaliadas.

Conforme ilustrado na figura 7, as sequências 2 e 3 viabilizaram a formação das microesferas, os sobrenadantes dos sistemas foram analisados pela Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis e os valores de absorvância obtidos foram: solução branco ou controle 0,03 e do sobrenadante em duplicata 0,08 e 0,11 o que sugere que quase a totalidade de albumina adicionada foi imobilizada no suporte sólido (a microesfera constituída de quitosana e polifosfato) pela ausência no sobrenadante.

Os testes realizados para otimização na preparação das microesferas e da sequência de adição da proteína foram necessários para propor uma metodologia de imobilização das enzimas nas microesferas como suporte. Para tanto, avaliou-se a eficiência da imobilização através da determinação do teor de proteínas (Bradford, 1976) do sobrenadante resultante após o processo de formação das esferas, onde foi possível determinar a ausência de proteínas na solução, evidenciando, portanto, que as mesmas foram encapsuladas no suporte formado.

Após a confirmação das microesferas de quitosana-polifosfato como suporte proteico, a metodologia otimizada para os testes com albumina foi aplicada para imobilização da enzima lipase CAL B, essa biomacromolécula é uma das enzimas produzidas por fungos basidiomicetos. A figura 46 resume a metodologia adotada, assim como mostra o registro das microesferas com a enzima lipase imobilizada.

Figura 46. A - Metodologia adotada para a imobilização da enzima lipase e B - foto das microesferas obtidas depois da imobilização



Fonte: Próprio Autor.

Os valores de absorbância obtidos foram: solução controle 0,52 e do sobrenadante em duplicata 0,00 o que sugere que a totalidade de lipase adicionada foi imobilizada de forma satisfatória nas microesferas. Foi ainda testado uma etapa adicional de lavagem utilizando tampão fosfato pH 7,0, porém novamente os espectros eletrônicos não apresentaram absorções referentes à enzima no líquido residual, comprovando que a enzima está imobilizada e não adsorvida na microesfera. A verificação do teor de enzima imobilizada no suporte foi verificada através da determinação do teor de proteínas (BRADFORD, 1976) da solução quitosana/enzima (proteína) inicial e do sobrenadante após processo de imobilização, conforme mostra a equação III.

$$I\% = 100 \left[ 1 - \frac{\text{teor de proteína no sobrenadante}}{\text{teor de proteína livre}} \right] \quad \text{III}$$

Onde:

Teor de proteína no sobrenadante = Concentração da proteína imobilizada, em mg/L

Teor de proteína livre = Concentração da proteína livre, em mg/L

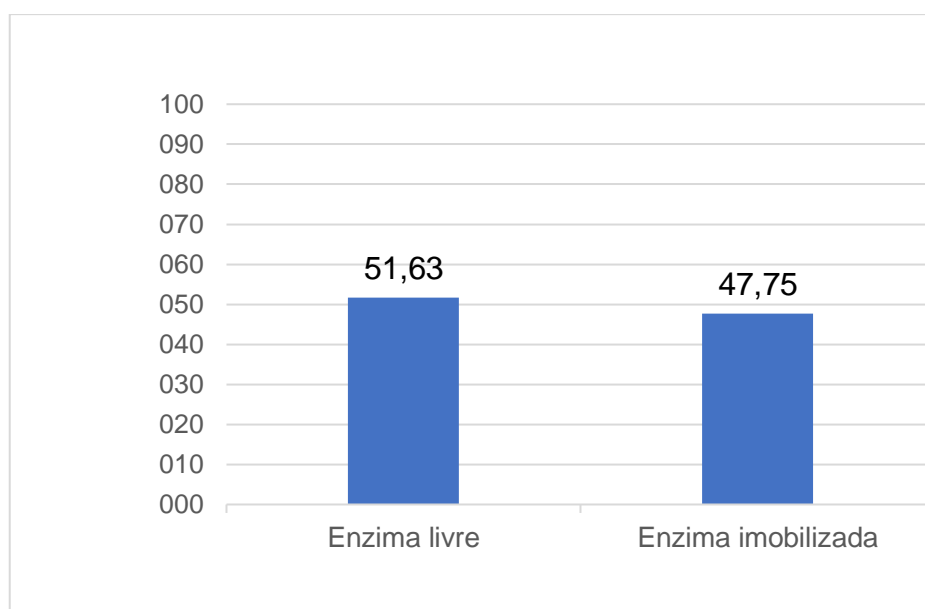
### 5.5.1 Atividade hidrolítica

O teste de atividade hidrolítica visa verificar se o suporte inativou a enzima lipase, para isso a hidrólise do acetato de *p*-nitrofenila (substrato) forma o *p*-nitrofenol (PNP) sendo a concentração deste quantificada espectrofotometricamente a 400 nm. O tempo reacional de cada sistema foi de 10 minutos sob agitação magnética. A atividade enzimática (A) pode ser calculada pela equação IV.

$$A = \frac{\text{umol (PNP)}}{\text{mg(enzima livre ou imobilizada).t (min)}} \quad \text{IV}$$

Quando comparado a atividade hidrolítica da enzima livre e da enzima imobilizada percebe-se que a capacidade catalítica do biocatalisador é preservada quando o mesmo passa a ser incorporado ao suporte de polifosfato-quitosana, mantendo 92% da atividade hidrolítica da enzima livre. Isso evidencia que o suporte desenvolvido não compromete a atividade catalítica da enzima (Figura 47).

Figura 47. Gráfico comparativo entre as atividades das enzimas livre e imobilizadas na microesfera



Fonte: Próprio Autor.

Para os próximos testes, as microesferas com a enzima lipase imobilizada foram mantidas na estufa a 30°C por 24h.

### 5.5.2 Estabilidade da enzima lipase imobilizada com o tipo de solvente

A utilização de proteínas e enzimas apresenta limitações reacionais pela instabilidade dessas substâncias no meio, o suporte proposto deve garantir a integridade e a atividade enzimática para ter validade. Nesse sentido, o primeiro teste foi a variação do solvente. Os solventes orgânicos nas proporções mais usuais foram utilizados como parâmetros reacionais, conforme descrição detalhada na tabela 21.



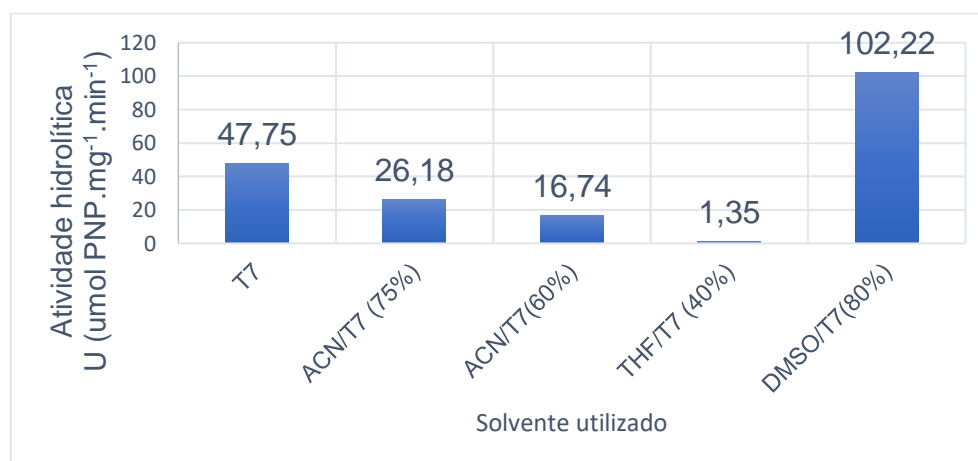
Tabela 21. Resultados de absorvância para cada solvente testado

Solventes	ABS (bco/sobren)
<b>Acetonitrila 25% (ACN/Tampão 7)</b>	0,216/0,588
<b>Acetonitrila 40%</b>	0,115/0,358
<b>THF 60%</b>	0,064/0,087
<b>DMSO 20%</b>	1,155/2,620

Fonte: dados da pesquisa.

A atividade hidrolítica da enzima imobilizada nas microesferas, verificadas para diferentes combinações de solventes, demonstrou melhor desempenho no meio constituído de dimetilsulfóxido/tampão 7 e a menor atividade quando usado tetraidrofurano/tampão 7, como solvente da reação. Importante destacar que embora a atividade hidrolítica tenha variado nos diferentes solventes, em todos eles a enzima imobilizada demonstrou-se ativa, conforme mostrado na figura 48.

Figura 48. Gráfico que relaciona a atividade com o tipo de solvente



Fonte: Próprio Autor.

A enzima imobilizada no suporte mostrou melhor desempenho no meio constituído por dimetilsulfóxido (DMSO)/tampão 7,0, a atividade nesse solvente foi maior do que o dobro no solvente em meio aquoso puro. A acetonitrila apresentou um efeito negativo maior em 60% do que em 75%, sugerindo o manuseio desse meio em concentrações mais baixas. É importante ressaltar que, embora a atividade hidrolítica

tenha sofrido influência do meio, em todos os solventes testados a enzima imobilizada mostrou atividade.

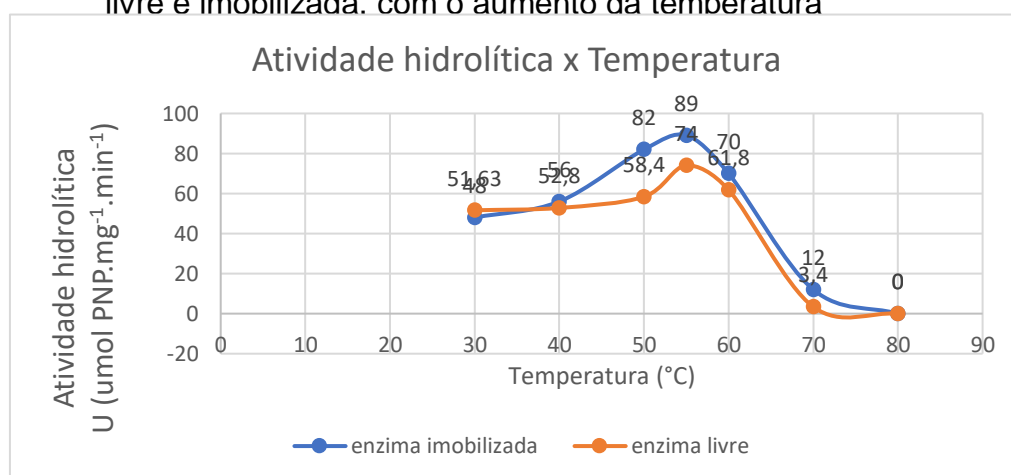
E ainda, que em misturas binárias de solventes com maior constante dielétrica (água, acetonitrila e DMSO) resultaram em maior atividade hidrolítica. Esta alta resistência da enzima frente aos diferentes solventes orgânicos se deve em parte a forma escolhida de imobilização, a microencapsulação que protege a enzima do meio.

### 5.5.3 Estabilidade da enzima lipase imobilizada com a variação da temperatura

Um dos fatores cruciais no estudo de atividade enzimática é a temperatura, o suporte proposto com a enzima lipase imobilizada foi testado nas temperaturas de 40, 45, 50, 55, 60, 70 e 80°C. As microesferas só foram adicionadas a cada sistema testado a medida que a temperatura de análise foi atingida.

A termoestabilidade das enzimas imobilizadas foi acompanhada por Espectroscopia eletrônica na região do UV-Vis e os resultados estão reunidos na figura 49. Os valores de absorbância registrados mostram um aumento na velocidade de reação até a temperatura de 55°C, demonstrando um decréscimo de atividade a partir de 60°C e a inativação da enzima na temperatura de 80°C.

Figura 49. Gráfico que relaciona a atividade hidrolítica da enzima, nas formas livre e imobilizada, com o aumento da temperatura



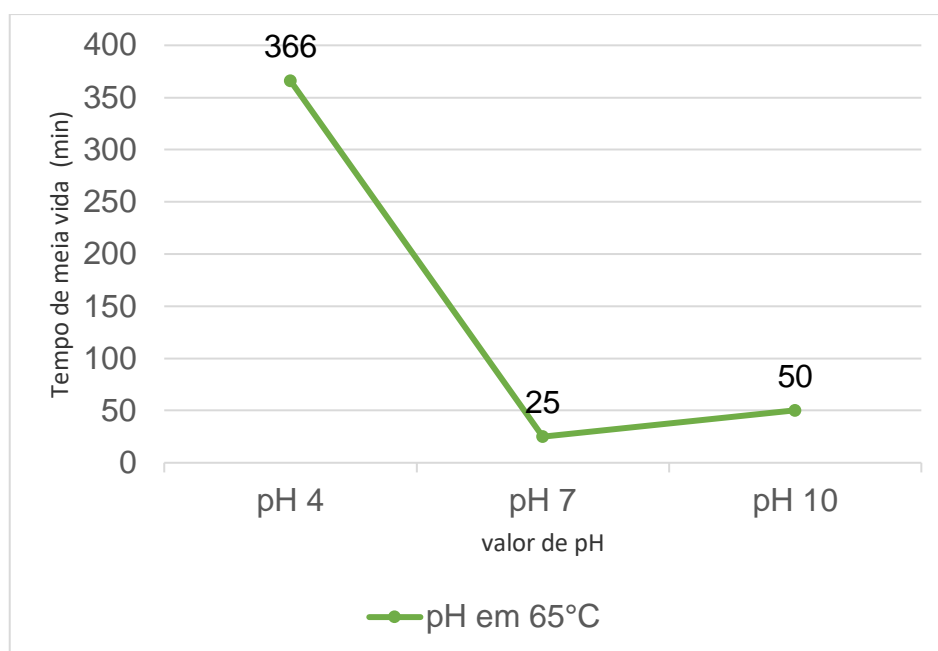
Fonte: Próprio autor.

Os resultados mostram uma capacidade promissora do suporte na manutenção da atividade hidrolítica da enzima quando comparada com o desempenho da enzima livre, que a uma temperatura de 50°C perde mais de 80% da atividade.

#### 5.5.4 Estabilidade das enzimas imobilizadas no suporte em diferentes pHs

A análise da estabilidade do suporte enzimático proposto em diferentes valores de pH é mostrada na figura 50. A enzima é muito estável a pH 4,0, com uma meia-vida de 366 min. Quando o meio é básico (pH 10,0), a meia-vida diminuiu para 50 min. Em pH 7,0 a meia-vida é ainda menor, apenas 25 min. Em pH 7, a enzima pode interagir com as *cargas positivas e negativas dos polieletrólitos*, aparentemente que conduzem à sua inativação mais rapidamente do que os valores de pH extremos.

Figura 50. Tempo de meia vida da enzima imobilizada em suporte de quitosana polifosfato em diferentes valores de pH



Fonte: Próprio Autor.

O comportamento em meio ácido reforça os resultados obtidos no Raman confocal que o polifosfato forma a concha (parte externa da microesfera), pois esse polímero apesar de sofrer hidrólise é mais resistente em meio ácido quando comparado à quitosana, solúvel somente em meio ácido. Desta forma, em pH ácido, a microesfera parece ser totalmente estável, e isso impediu a inativação da enzima.

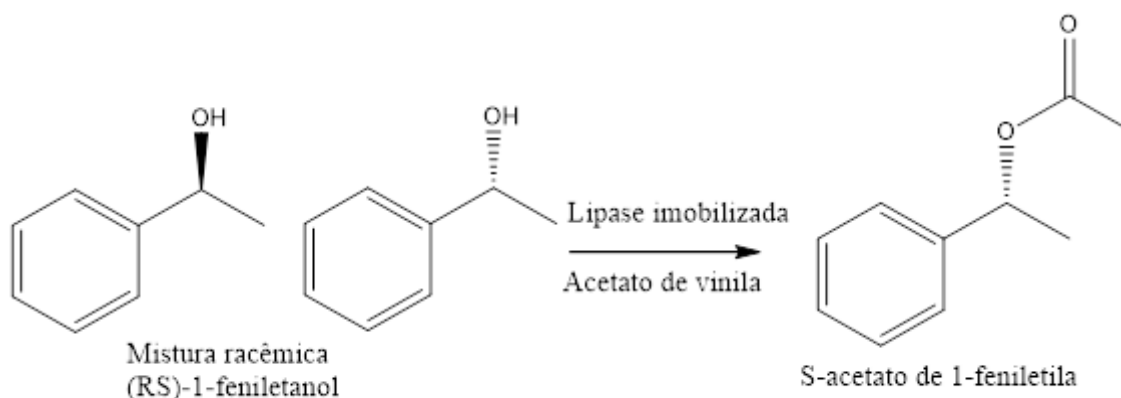
Comparativamente o desempenho das microesferas produzidas a partir de quitosana e polifosfato (o suporte enzimático proposto) demonstrou resultados promissores principalmente na permanência da atividade enzimática em meios ácidos com tempo de meia vida de 366 minutos, valor superior aos apresentados na literatura (FUJII *et al.*, 2009; TEIXEIRA, 2014).

## 5.5.5 Catálise em reações orgânicas

### 5.5.5.1 Reação de transesterificação

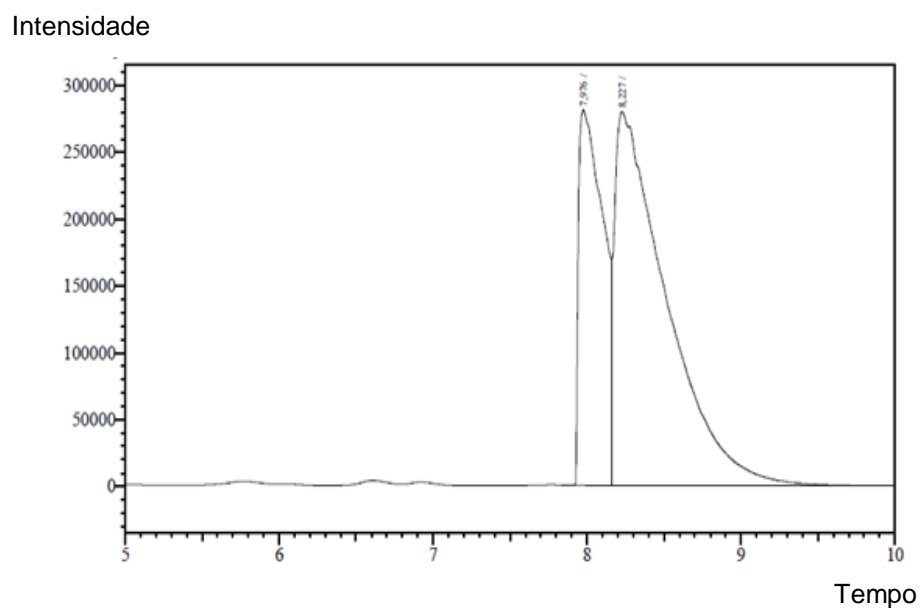
A enantiosseletividade reflete a capacidade que o catalisador possui em diferenciar um par de enantiômeros, propriedade essa muito requerida na síntese de moléculas biologicamente ativas, uma vez que, as mesmas são em grande parte constituídas de substâncias opticamente ativas. A enzima imobilizada foi avaliada frente a reação de acetilação da mistura racêmica do (*RS*)-1- feniletanol, que foi caracterizado por cromatografia gasosa com coluna quiral (Figura 51).

Figura 51. Esquema reacional da reação enantiosseletiva catalisada pela enzima lipase imobilizada pelo suporte de quitosana e polifosfato

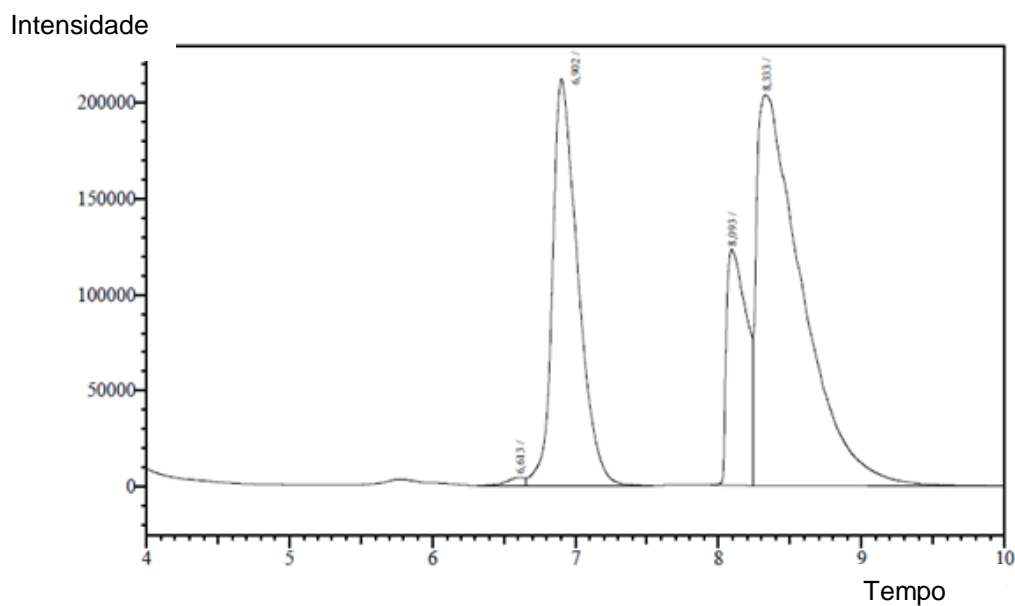


Fonte: Próprio Autor.

O suporte apresentou boa enantiosseletividade, com excesso enantiomérico de 99% na reação de acetilização da mistura racêmica do (*RS*)-1-feniletanol (Figura 52). Isso indica que uma boa habilidade do biocatalisador em diferenciar um par de enantiômero presente em uma mistura racêmica.

Figura 52. Cromatograma CG-DIC do padrão (*RS*) - 1 - feniletanol.

Fonte: Próprio Autor.

Figura 53. Cromatograma CG-DIC da reação de acetilação do (*RS*) - 1 – feniletanol catalisada pela enzima imobilizada no suporte após 48h

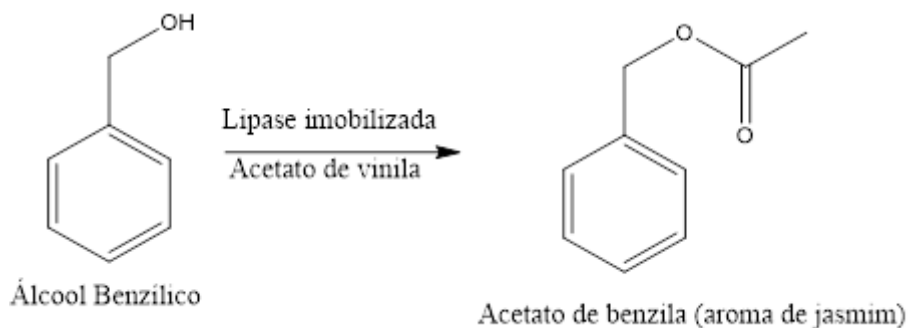
Fonte: Próprio Autor.

### 5.5.5.2 Síntese enzimática do aroma de jasmim

Outro potencial de aplicação das microesferas com lipase imobilizadas, avaliado neste trabalho foi a possibilidade de sintetizar o aroma artificial de jasmim, o acetato

de benzila. Essa substância possui ampla aplicação no setor de cosméticos e aromas. A síntese mostrou-se viável, com as enzimas imobilizadas sendo capazes de realizar a reação de acetilação do álcool benzílico formando o respectivo acetato com teor de conversão chegando a 98% após 72h de reação (Figura 54).

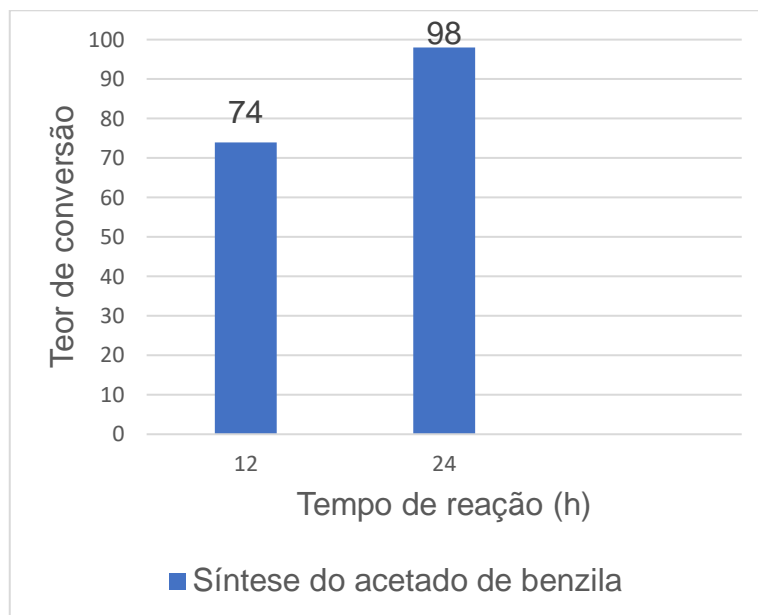
Figura 54. Reação de síntese do aroma de jasmim catalisada pelas enzimas imobilizadas em suporte de quitosana-polifosfato



Fonte: Próprio Autor.

Para a síntese do acetato de benzila, aroma do jasmim, foram avaliados sistemas reacionais contendo diferentes quantidades do álcool benzílico (10, 20, 30, 40, 50 e 100  $\mu\text{L}$ ) e mantendo-se as massas do biocatalisador imobilizado (5mg) e doador acila (100 $\mu\text{L}$ ) constantes. A reação foi avaliada em diferentes tempos de reação (24, 48 e 72h), conforme mostra a figura 55.

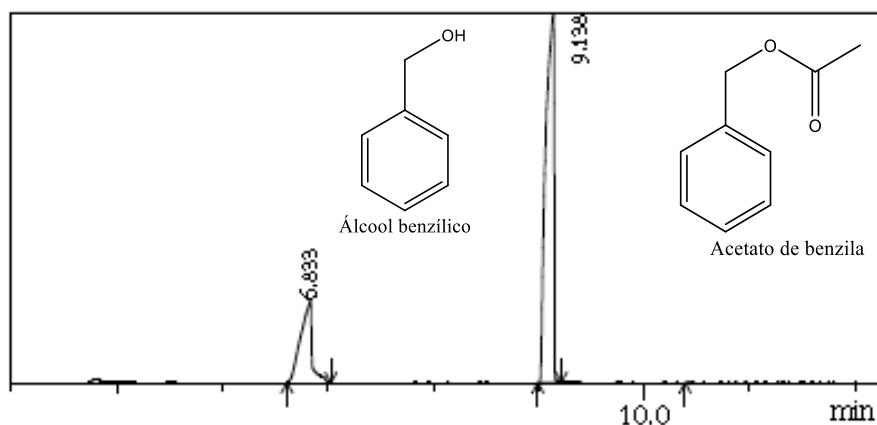
Figura 55. Gráfico que relaciona o teor de conversão e o tempo de reação



Fonte: Próprio Autor.

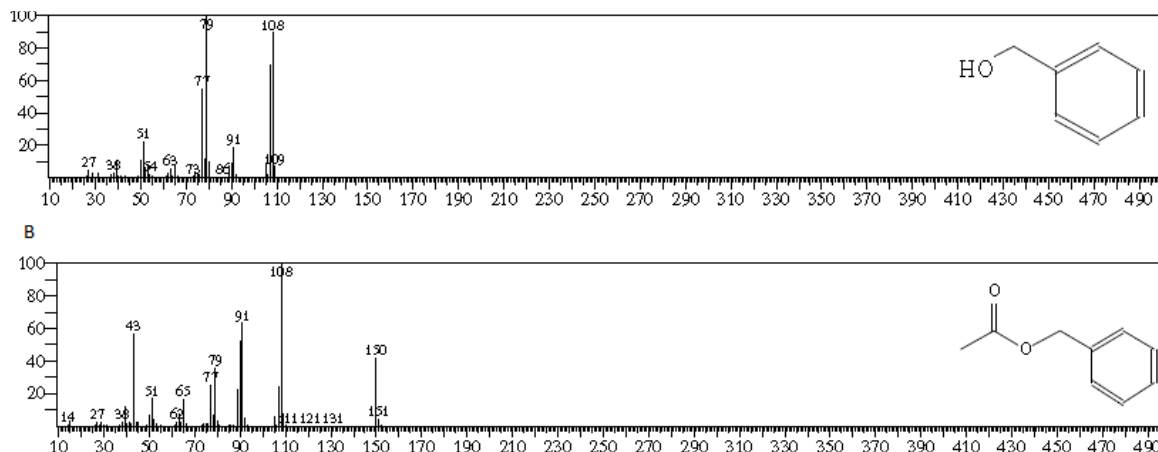
A caracterização do teor de conversão foi obtida através de análise por CG-EM, onde é possível verificar o álcool benzílico com o tempo de retenção de 6,8 min e o acetato de benzila com 9,1min (Figura 56). No espectro de massa do acetato de benzila (Figura 57) é verificado o pico íon molecular com  $m/z$  150, referente a síntese do éster esperado, ou seja, a massa do álcool benzílico (108g/mol) somada com a do grupo acil inserido na reação de acetilação.

Figura 56. Cromatograma por CG-EM da reação de acetilação após 12 h, catalisada pela enzima imobilizada



Fonte: Próprio Autor.

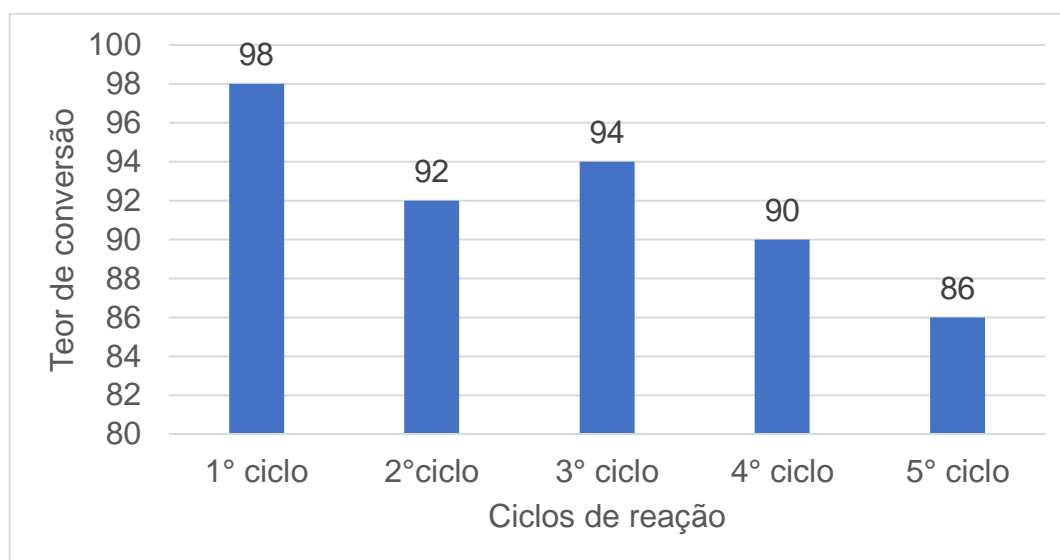
Figura 57. Espectro de massa do álcool benzílico (A) e do acetato de benzila (B)



Fonte: Próprio Autor.

Como o suporte apresentou um bom potencial de síntese do aroma artificial do jasmim (acetato de benzila), a possibilidade de reuso desse biocatalisador no suporte desenvolvido no presente trabalho também foi analisado. Foi possível constatar que a capacidade de síntese foi mantida após cinco ciclos de reação, com baixo decréscimo no rendimento da reação (Figura 58).

Figura 58. Gráfico que relaciona o teor de conversão e os ciclos de reutilização



Fonte: Próprio Autor.

Duas dimensões merecem destaques nesse potencial de catálise da lipase imobilizada no suporte ora desenvolvido. A primeira é que ele consegue manter a



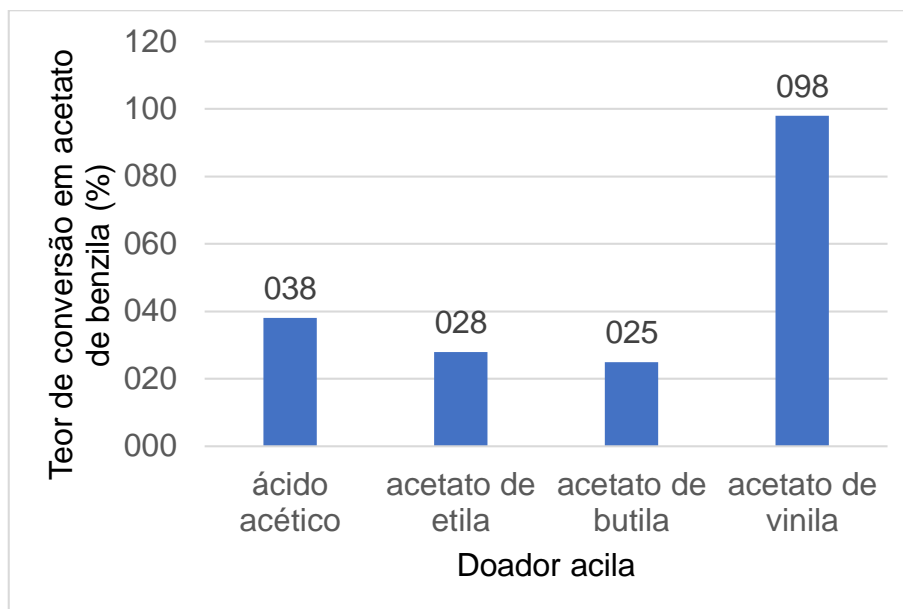
biomolécula (enzima) em uma conformação tridimensional que não compromete a reação de esterificação o que mostra que o suporte não impede a interação enzima-substrato em meio orgânico (solvente orgânico). Essa característica é muito importante, pois não requer etapas posteriores de extração e secagem do meio reacional que são necessários quando a reação se processa em meio aquoso (GUBICZA *et al.*, 2000; GOTOR-FERNÁNDEZ *et al.*, 2006; COSTA, 1999).

A segunda dimensão a ser destacada como uma propriedade significativa refere-se ao fato do suporte permitir o reuso do biocatalisador sem comprometer a sua eficiência de forma significativa até cinco ciclos sucessivos de reação. Essa habilidade é crucial para a aplicação de enzimas em sínteses orgânicas tendo em vista o elevado custo desses biocatalisadores, o que faz o processo de imobilização ser um diferencial competitivo para a viabilidade de um sistema de síntese que tem como base um catalisador de alto valor. O fato do suporte ser constituído de materiais biodegradáveis e atóxicos é também um elemento diferencial já que permite a sua aplicação inclusive em indústria de alimentos, ampliando ainda mais o espectro de potenciais aplicações desse biocatalisador (MEZTLER *et al.*, 2014; BOLIVAR *et al.*, 2009).

### **5.5.5.3 Avaliação do efeito do doador acila na síntese do acetato de benzila**

Quando a reação de síntese do acetato de benzila foi avaliada usando diferentes doadores acilas (ácido acético, acetato de etila, acetato de vinila, acetato de butila) foi possível verificar que houve maior rendimento na reação de acilação quando se usa o acetato de vinila, alcançando teor de conversão de 98% (Figura 59).

Figura 59. Gráfico que relaciona o teor de conversão e o efeito do doador acila

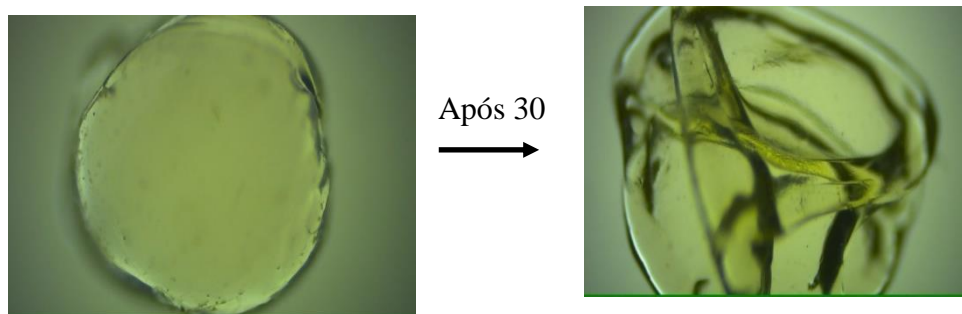


Fonte: Próprio Autor.

Essa conversão, obtida em condições muito suaves, é muito promissora quando se leva em consideração que muitas reações químicas para acetilação de álcoois que ocorrem em um período de reação semelhante, utilizam catalisadores tóxicos (por exemplo, piridina) e recuperação onerosa, em geral, impraticáveis (TEIXEIRA *et al.*, 2014; LARKOV, 2008). O processo proposto que utiliza a enzima imobilizada nesse trabalho, além de viabilizar um suporte enzimático atóxico e biodegradável, as enzimas podem ser recuperadas a partir do meio por filtração simples. Esta característica é um diferencial importante, tanto do ponto de vista ambiental como operacional em reações químicas clássicas de acetilação.

As microesferas produzidas no meio apresentaram elevada polidispersividade e homogeneidade no meio, porém as microesferas de quitosana e polifosfato se rompem ao final de 30 dias (em uma situação de lavagem com água e solução tampão fosfato pH 7,0 e sem tratamento térmico para secagem) a temperatura ambiente, conforme ilustrado nas fotos da figura 60.

Figura 60. Fotos de uma microesfera com lipase imobilizada, obtidas por um microscópio óptico com ampliação de 50x



Fonte: Próprio Autor.

As microesferas com lipase imobilizadas ainda foram caracterizadas por a) Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e b) análise termogravimétrica.

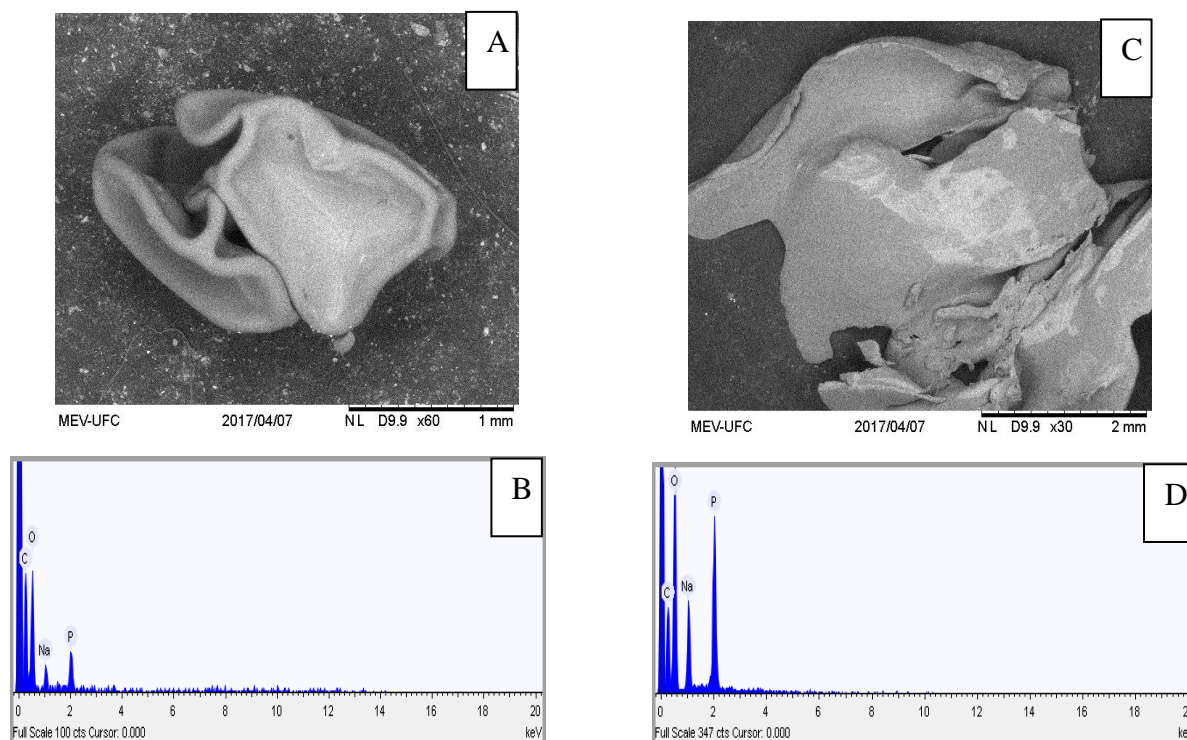
### 5.5.6 Caracterização das microesferas imobilizadas com lipase

#### 5.5.6.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A fim de confirmar a composição híbrida do suporte enzimático proposto, a microesfera constituída de quitosana e polifosfato de sódio, as amostras com e sem enzima imobilizadas foram analisadas pela Espectroscopia de Energia Dispersiva (EDS) acoplado ao MEV (Figura 61).

Com base nos resultados, nem toda a composição da enzima pode ser detectada (C, H, O, N e S) devido ao limite de detecção do equipamento, porém uma diferença entre as análises que merece destaque é a composição percentual de fósforo na amostra com enzima imobilizada, o que pode ser explicada pela interação do sítio ativo de polifosfato com cargas positivas presentes na enzima. Visualmente foi observado que ao misturar a enzima lipase diretamente em uma solução de polifosfato o sistema apresentou uma turbidez considerável (como indicativo visual da existência de interação). Ainda, o ponto isoeletrônico da lipase é 6,0, todos os precursores e sobrenadantes apresentaram pH abaixo desse valor o que se espera do meio uma carga residual positiva.

Figura 61. Micrografias da microesfera seca em A, a análise da composição por EDS em B. EM C a micrografia da microesfera imobilizada com lipase seca e em D a análise da composição po EDS



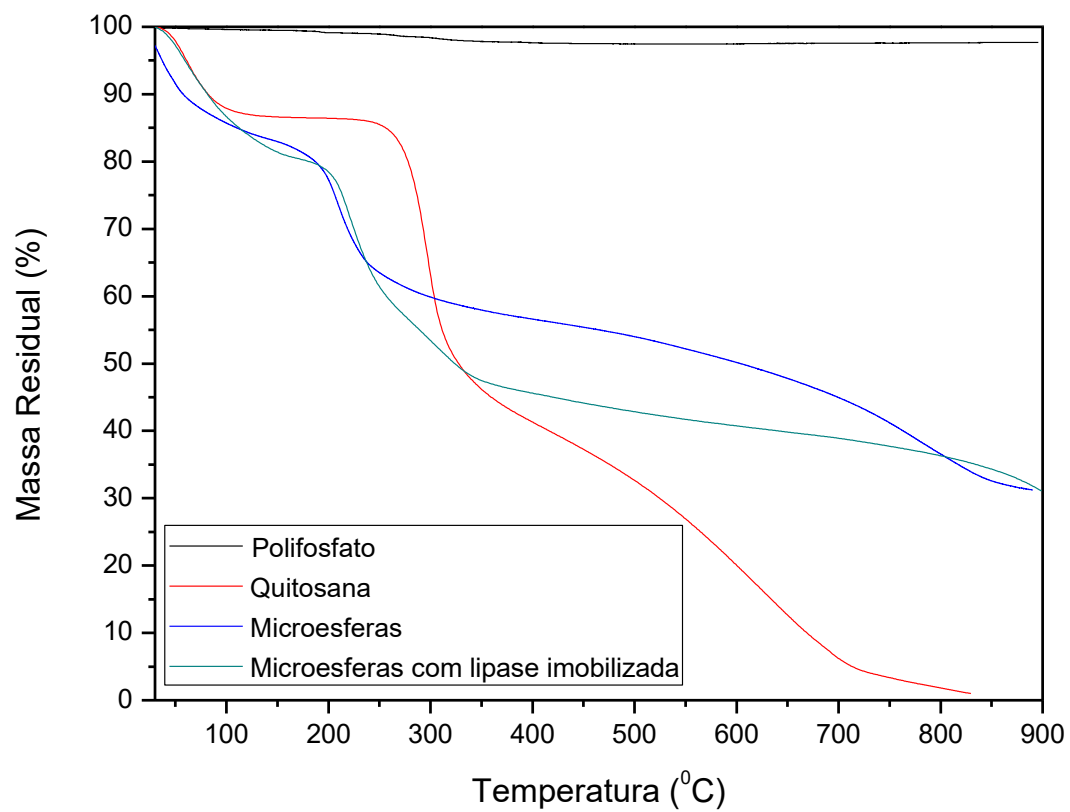
Fonte: Próprio Autor.

### 5.5.6.2 Análise Termogravimétrica

A análise termogravimétrica demonstra que o polifosfato de sódio praticamente não apresenta perda de massa em função do aumento da temperatura, apresentando um percentual residual em massa de 97,6%. Todas as curvas termograviméticas estão reunidas na figura 62.

No estudo térmico da quitosana, observou-se dois eventos: o primeiro, corresponde ao processo de desidratação em torno de 220°C e o segundo, em torno de 449°C corresponde ao processo de decomposição, que continua além do limite de temperatura do experimento que resultou em uma massa residual de 1,8%. A curva de decomposição das microsferas visivelmente apresenta um perfil intermediário entre os precursores, apresenta um único evento bem definido em torno de 189°C característico de desidratação e apresentou massa residual de 36,8%, o que sugere a presença de polifosfato de sódio e quitosana na estrutura.

Figura 62. Curvas termogravimétricas dos precursores e da amostra de microesferas formadas e das microesferas com a enzima lipase imobilizada



Fonte: Próprio Autor.

## 6 CONCLUSÃO

Os poliânions de fosfatos condensados lineares, como o polifosfato de sódio, possuem a versatilidade de interação com íons metálicos (ou seja, cátions preferencialmente divalentes) ou com um políon catiônico ao longo promovendo um entrelaçamento das cadeias poliméricas. Uma nova possibilidade para a preparação de coacervados misturando soluções de sal com dois íons à solução de polifosfato foi apresentada e intitulada de coacervação mista. A coacervação pode ser espontânea ou não espontânea, nesse sentido dois parâmetros são importantes: a entalpia de hidratação e do raio iônico dos íons metálicos divalentes. Para obter coacervação espontânea foi escolhido o maior íon com entalpia de hidratação menos negativa.

A interação entre os dois polímeros, quitosana e polifosfato de sódio, produziu microesferas que demonstraram ser um suporte enzimático promissor diante dos resultados obtidos pela encapsulação da enzima lipase CAL B. O novo biocatalizador enzimático proposto, composto por polifosfato de sódio e quitosana, mostrou-se eficiente na imobilização das enzimas e também permitiu a aplicação em meios orgânicos, com potencial uso na síntese orgânica. A natureza altamente iônica e híbrida do suporte fornece uma maior resistência da atividade enzimática em meios hidrofílicos e hidrofóbicos ampliando assim a aplicação em sínteses orgânicas.

Os resultados mostraram que a lipase imobilizada apresentou alta estabilidade térmica em uma faixa de 30°C a 70°C, mantendo alta atividade em solventes orgânicos, apresentando melhor estabilidade do que a lipase livre e, finalmente, é notável a estabilidade do biocatalisador em extremos Valores de pH, 4 e 10.

A estabilidade apresentada no meio ácido foi maior do que os valores relatados na literatura para outras preparações de CALB imobilizadas com meia vida de 366 minutos a 65°C. O biocatalisador mostrou um bom desempenho para as reações da síntese enzimática do composto responsável pelo aroma do jasmim com um rendimento de 98% após 24 h de reação.

## REFERÊNCIAS

ABIAN, O., WILSON, L., MATEO, C., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., PALOMO, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISÁN, J. M., RE, D., TAM, A., DAMINATTI, M. 2002. Preparation of artificial hyper-hydrophilic micro-environments (polymeric salts) surrounding enzyme molecules New enzyme derivatives to be used in any reaction medium. **J. Mol. Catal. B Enzym.** 19: 295–303.

ANDERSON, E. M., LARSSON, K. M.; KIRK, O. 1998. One biocatalyst many applications: the use of *Candida antarctica* b-lipase in organic synthesis. **Biocatalysis and Biotransformation.** 16: 181–204.

ANDREWS, H.E., ESMERALDA, K., RAMÍREZ, E., MÁRQUEZ, E.G., SANTIAGO, C.R., CALLEROS, C.L., CARTER, J.V. 2013. Interrelationship between the zeta potential and viscoelastic properties in coacervates complexes. **Carbohydrate Polymers**, 95: 161– 166.

ATACAN, K., LU, B.C., OZACAR, M. 2016. Improvement of the stability and activity of immobilized trypsin on modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticles for hydrolysis of bovine sérum albumin and its application in the bovine milk. **Food Chemistry**, 212: 460–468.

BARBOSA, O.; ORTIZ, C.; BERENGUER-Murcia, A.; TORRES, R.; RODRIGUES, R. C.; FERNÁNDEZ-Lafuente, R. 2015. Strategies for the one-step immobilization-purification of enzymes as industrial biocatalysts. **Biotechnol. Adv.**, 33: 435–456.

BARROW, C.J., NOLAN, C., HOLUB, B.J. 2009. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. **Journal of functional foods I**, 38-43.

BERGER, R. G. 2009. Biotechnology of flavours — the next generation. **Biotechnol Letter**, 31: 1651–1659.

BEZERRA, R.M., ANDRADE NETO, D.M., GALVÃO, W.S., RIOS, N. S., CARVALHO, A.C.L.M., CORREA, M.A., BOHN, F., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., FECHINE, P. B. A.; DE MATTOS, M. C., DOS SANTOS, J.C.S., GONÇALVES,

- L.R.B. 2017. Design of a lipase-nano particle biocatalysts and its use in the kinetic resolution of medicament precursors. *Biochem. Eng. J.*, 2017: 1–45.
- BOLIVAR, J. M., ROCHA-MARTIN, J., MATEO, C., CAVA, F., BERENQUER, J., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GUISAN, J. M. 2009. Coating of soluble and immobilized enzymes with ionic polymers: Full stabilization of the quaternary structure of multimeric enzymes. *Biomacromolecules*, 10: 742–747.
- BONAZZA, H. L., MANZO, R. M., SANTOS, J. C. S., MAMMARELLA, E. J. 2017. Operational and Thermal Stability Analysis of *Thermomyces lanuginosus* Lipase Covalently Immobilized onto Modified Chitosan Supports. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2017: 1-15.
- BORNSCHEUER, U. T. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev.*, 26: 73-81.
- BOSNEA, L.A., MOSCHAKIS, T., BILIADERIS, C.G. 2014. Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses. *Food Bioprocess Technol.*, 7: 2767–2781.
- BLOISIA, F., CALIFANO, V., PERRETTA, G., NASTID, L., ANTONIO ARONNE, R. D., ROSA, C. D. 2016. Lipase immobilization for catalytic applications obtained using fumed silica deposited with MAPLE technique. *Applied Surface Science*, 374: 346–352.
- BRADFORD, M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein– dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248–2541.
- BRADY, D., JORDAAN, E.J. 2009. Review - Advances in enzyme immobilisation. *Biotechnol Lett.*, 31:1639–1650.
- BROW, R.K. 2000. Review: the structure of simple phosphate glasses. *J. Non-Cryst. Solids*, 263–264: 1–28.
- BRENA, B.M., BATISTA-VIEIRA, F. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells, Second Edition. Chapter 2 - Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. Edited by: J. M. *Guisan* © *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ. 2006.



- CANELLA, K. M.N. C., GARCIA, R. B. 2001. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, 24: 13–17.
- CHEN, Y. LIU, J., XIA, C., ZHAO, C., REN, Z., ZHANG, W. 2014. Immobilization of lipase on porous monodisperse chitosan microspheres. **International Union of Biochemistry and Molecular Biology, Inc.** 62: 101–106.
- CHEN, Y., LIU, J., XIA, C., ZHAO, C., REN, Z., & ZHANG, W. 2015. Immobilization of lipase on porous monodisperse chitosan microspheres. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 62: 101-106.
- CHEN, Y., ZHU, X.Y., GAO, Q.L., FANG, L.W.W., HUANG, X.J. 2016. Immobilization of lipase onto functional cyclo matrix polyphosphazene microspheres. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 132: 67–74.
- CINI, N., BALL, V. 2014. Polyphosphates as inorganic polyelectrolytes interacting with oppositely charged ions, polymers and deposited on surfaces: fundamentals and applications. **Advances in Colloid and Interface Science**, 209: 84–97.
- CIPOLATTI, E. P., SILVA, M.J.A.; KLEIN, M., FEDDERN, V., FELTES, M.M.C., OLIVEIRA, J. V.; NINOW, J. L.; DE OLIVEIRA, D. 2014. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal Mol. Catal. B: Enzymatic**, 99, 56–67.
- COSTA, V.E.U., DE AMORIM, H.L.N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: aspectos gerais sobre a influência do solvente. 1999. **Química nova**, 22(6):863-873.
- CUI, Y., CHEN, X., LI, Y., LIU, X., LEI, L., Xuan, S. 2012. Novel magnetic microspheres of P (GMA-b-HEMA): preparation, lipase immobilization and enzymatic activity in two phases. **Appl Microbiol Biotechnol.**, 95:147–156.
- CUI, L., WEI, J., DU, X., ZHOU, X. 2016. Preparation and Evaluation of Self-Assembled Porous Microspheres – Fibers for Removal of Bisphenol A from Aqueous Solution. **Ind. Eng. Chem. Res.**, 55: 1566–1574.
- DE OLIVEIRA, C. I. R.; DE OLIVEIRA, L. F. C.; DIAS FILHO, F. A.; MESSADDEQ, Y.; RIBEIRO, S. J. L. 2005. Spectroscopic investigation of a new hybrid glass formed

by the interaction between croconate ion and calcium polyphosphate. ***Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.***, 61: 2023–2028.

DE SOUZA, T. C., FONSECA, T. D. S., JESSYCA, A., VALDEREZ, M., ROCHA, P., Carlos, M., MATTOS, D., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GONÇALVES, L. R. B., DOS SANTOS, J. C. S. 2016. Enzymatic Cashew apple bagasse as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica*: Application to the chemoenzymatic production of (*R*) - Indanol. ***J. Mol. Catal. B Enzym.***, 130: 58–69.

DE QUEIROZ, A. A. A., PASSES, E. D., DE BRITO ALVES, S., SILVA, G. S., HIGA, O. Z., VÍTOLO, M. 2006. Alginate-poly(vinyl alcohol) core-shell microspheres for lipase immobilization. ***J. Appl. Polym. Sci.***, 102: 1553–1560.

DELBAERE, C.D., BURON, C.C., EUVRAD, M., FILIÂTRE, C. 2016. Stability and cathodic electrophoretic deposition of polystyrene particles pre-coated with chitosan–alginate multilayer. ***Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects***. 493: 1–8.

DIAS FILHO, F. A. Preparação e Caracterização de colóides e vidros a base fosfatos dopados com íons lantanídeos via coacervação. **Tese de Doutorado**. Araraquara SP, 2003.

DICOSIMO, R.; MCAULIFFE, J.; POULOSE, A. J.; BOHLMANN, G. 2013. Industrial use of immobilized enzymes. ***Chem Soc Rev.***42: 6437–6474.

DOS ANJOS, F.S.C. Filmes e beads à base de quitosana: incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede. 2005. Dissertação (Mestrado em química). **Universidade Federal do Pernambuco**, Recife, Pernambuco.

DOS SANTOS, J. C. S., BARBOSA, O., ORTIZ, C., BERENQUER-MURCIA, A. 2015. Importance of the Support Properties for Immobilization or Purification of **Enzymes**. ***ChemCatChem.***, 7: 2413–2432.

DOS SANTOS, J. C. S., RUEDA, N., SANCHEZ, A., VILLALONGA, R., GONÇALVES, L. R. B., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. 2015. Versatility of

divinylsulfone supports permits the tuning of CAL B properties during its immobilization. *RSC Adv.*, 2015: 35801–35810.

DOS SANTOS, J. C. S., BONAZZA, H. L., DE MATOS, L. J. B. L., CARNEIRO, E. A., BARBOSA, O., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., GONÇALVES, L. R. B., DE SANT'ANA, H. B., SANTIAGO-AGUIAR, R. S. 2017. Immobilization of CAL B on activated chitosan: Application to enzymatic synthesis in supercritical and near-critical carbon dioxide. *Biotechnol. Reports*, 14: 16–26.

DURSUN, B.Y., CIGIL, A.B., DONGEZ, D., KAHRAMAN, M.V., OGAN, A., DEMIR, S. 2016. Preparation and characterization of sol–gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 127: 18–25.

FARIAS, P.V.S., Aragão, D.C., Farias, M.V., Correia, L.M., Carvalho, T.V., AGUIAR, J.E., VIEIRA, R.S. 2015. Natural and cross-linked chitosan spheres as adsorbents for diesel oil removal. *Adsorption Science & Technology*, 33 (9): 783-792.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. 2009. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme Microb. Technol.*, 45: 405–418.

FRANCO, D.F., BARUD, H.S., SANTAGNELI, S., LAMARCA, R.S., SANTOS, B.F., SILVA, M.A.P., DE OLIVEIRA, L.F.C., RIBEIRO, S.J.L., NALIN, M. 2016. Preparation and structural characterization of sodium polyphosphate coacervate as a precursor for optical materials. *Materials Chemistry and Physics*, 180: 114-121.

FUJII, M; ISHII, S.; SAITOB, R.; AKITA, H. 2009. Enzymatic resolution of albacanol and its application to the synthesis of (–) copalic acid. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 59: 254–260.

GARCIA-GALAN, C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., RODRIGUES, R. C. 2011. Potential of Different Enzyme Immobilization Strategies to Improve Enzyme Performance. *Adv. Synth. Catal.*, 35: 2885–2904.

GARLAPATI, V. K., KUMARI, A., MAHAPATRA, P., BANERJEE, R. 2013. Modeling, Simulation, and Kinetic Studies of Solvent-Free Biosynthesis of Benzyl Acetate. *Journal of Chemistry*, 2013: 1–9.

- GIORNO, L., YAN, M., PIACENTINI, E. 2017. Development of enzyme-loaded PVA microspheres by membrane emulsification. *Journal of Membrane Science*, 524: 79–86.
- GOTOR-FERNÁNDEZ, V., BUSTO, E., GOTOR, V. *Candida antarctica* Lipase B: An Ideal Biocatalyst for the Preparation of Nitrogenated Organic Compounds. 2006. *Adv. Synth. Catal.*, 2006: 797 – 812.
- GRIEBENOW, K., LAUREANO, Y. D., SANTOS, A. M., CLEMENTE, I. M., RODRÍGUEZ, L., VIDAL, M. W., & BARLETTA, G. 1999. Improved Enzyme Activity and Enantioselectivity in Organic Solvents by Methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *J. Am. Chem. Soc.*, 121 (36): 8157–8163.
- GROBOILLOT, A.F., CHAMPAGNE, C.P., DARLING, G.D., PONCELET, D., NEUFELD, R.J. 1993. Membrane Formation by Interfacial Cross-Linking of Chitosan for Microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.*, 42: 1157–1163.
- GUBICZA, L., KABIRI-BADR, A., KEOVES, E., BELAFI-BAKO, K. 2000. Large-scale enzymatic production of natural flavour esters in organic solvent with continuous water removal. *Journal of Biotechnology*, 84:193–196.
- GUPTA, K. C.; JABRAIL, F. H. 2006. Preparation and characterization of sodium hexameta phosphate cross-linked chitosan microspheres for controlled and sustained delivery of centchroman. *Int. J. Biol. Macromol.*, 38: 272–283.
- GUPTA, A., TERRELL, J. L., FERNANDES, R., DOWLING, M. B., PAYNE, G. F., RAGHAVAN, S. R., BENTLEY, W. E. 2013. Encapsulated fusion protein confers “sense and respond” activity to chitosan-alginate capsules to manipulate bacterial quorum sensing. *Biotechnol. Bioeng.*, 110: 552–562.
- GUTERMAN, I., MASCI, T., CHEN, X., NEGRE, F., PICHERSKY, E., DUDAREVA, N., WEISS, D., VAINSTEIN, A. 2006. Generation of phenylpropanoid pathway-derived volatiles in transgenic plants: rose alcohol acetyltransferase produces phenylethyl acetate and benzyl acetate in petunia flowers. *Plant Mol. Biol.*, 60: 555–563.

- HOLLAND, B.J., ADCOCK, J.L., NESTERENKO, P.N., PERISTYY, A., STEVENSON, P.G., BARNETT, N.W., CONLAN, X.A., FRANCIS, P.S. 2014. The importance of chain length for the polyphosphate enhancement of acidic potassium permanganate chemiluminescence. ***Analytica Chimica Acta***, 842: 35–41.
- HUHEEY, J. E.; KEITER, E. A.; KEITER, R. L. 1993. Inorganic Chemistry: principles of structure and reactivity. 4. ed. **New York: Harper Collins**.
- HUNG, T.C., GIRIDHAR, R., CHIOU, S.H., & Wu, W.T. 2003. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 26: 69-78.
- HUO, W., XIE, G., ZHANG, W., WANG, W., SHAN, J., LIU, H., ZHOU, X. 2016. Preparation of a novel chitosan-microcapsules/starch blend film and the study of its drug-release mechanism. ***International Journal of Biological Macromolecules***, 87: 114–122.
- IFEDUBA, E.A., AKOH, C.C. 2015. Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in Maillard reaction-modified complex coacervates. ***Food Chemistry***, 199: 524–532.
- JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. 2014. Enzyme immobilization by adsorption: a review. ***Adsorption***, 20: 801–821.
- JIANG, R., ZHU, H.Y., CHEN, H.H., YAO, J., FU, Y.Q., ZHANG, Z.Y., XU, Y.M. 2014. Effect of calcination temperature on physical parameters and photocatalytic activity of mesoporous titania spheres using chitosan/poly (vinyl alcohol) hydrogel beads as a template. ***Applied Surface Science***, 319: 189–196.
- JU, X., PAN, J., YU, H. L., LI, C. X., XU, J. H. 2011. Improving *pseudomonas sp.* esterase performance by engineering approaches for kinetic resolution of 2-acetoxyphenylacetic acids. ***Biochemical Engineering Journal***, 57: 63-68.
- KIZILAY, E., KAYITMAZER, A.B., DUBIN, P.L. 2011. Complexation and coacervation of polyelectrolytes with oppositely charged colloids. ***Advances in Colloid and Interface Science***, 167: 24–37.

KOPP, W.; BARUD, H.S.; PAZ, M.F.; BUENO, L.A.; GIORDANO, R.L.C.; RIBEIRO, S.J.L. 2012. Calcium polyphosphate coacervates: effects of thermal treatment. ***J Sol-Gel Sci Technol.***, 63: 219–223.

KRAJEWSKA, B.; WYDRO, P.; KYZIOŁ, A. 2013. Chitosan as a subphase disturbant of membrane lipid monolayers. The effect of temperature at varying pH: I DPPG. ***Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.***, 434: 349–358.

KRAJEWSKA, B.; KYZIOŁ, A.; WYDRO, P. 2013. Chitosan as a subphase disturbant of membrane lipid monolayers. The effect of temperature at varying pH: II DPPC and cholesterol. ***Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.***, 434: 359–364.

KRAKOWIAK, A., TRZCIĄSKA, M., SIELIWANOWICZ, B., SAWICKA-ŹUKOWSKA, R., JĘDRYCHOWSKA, B., AJZENBERG, V. 2003. Properties of immobilized and free lipase from *rhizopus cohnii*. ***Pol. J. Food Nutr. Sci.***, 3: 39-44.

KULAKOVSKAYA, T.V. 2011. Review- Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine: Modern state and outlook. ***Process Biochemistry***, 1-10.

KULAKOVSKAYA, T.V.; VAGABOV, V.M.; KULAEV, I.S. 2012. Review- Inorganic polyphosphate in industry, agriculture and medicine: Modern state and outlook. ***Process Biochemistry***, 47: 1–10.

KUO, C., CHEN, G., CHEN, C., LIU, Y., SHIEH, C. 2014. Kinetics and optimization of lipase-catalyzed synthesis of rose fragrance 2-phenylethyl acetate through transesterification. ***Process Biochem.*** 49: 437–444.

KUMAR, M.N.V.R., MUZZARELLI, R. A. A., MUZZARELLI, C., SASHIWA, H., DOMB, A. J. 2004. Chitosan chemistry and pharmaceutical perspective. ***Chem. Rev.***, 104: 6017–6084.

KUMAR, R., MODAK, J., MADRAS, G. 2005. Effect of the chain length of the acid on the enzymatic synthesis of flavors in supercritical carbon dioxide. ***Biochemical Engineering Journal***, 23: 199–202.

LARKOV, O., ZAKS, A., BAR, E., LEWINSOHN, E., DUDAI, N., MAYER, A. M., RAVID, U. 2008. Enantioselective monoterpene alcohol acetylation in *Origanum*, *Mentha* and *Salvia* species. ***Phytochemistry***, 69: 2565–2571.

- LAUS, R., LARANJEIRA, M.C.M., MARTINS, A.O., FÁVERE, V.T. PEDROSA, R.C., BENASSI, J.C., GEREMIAS, R. 2006. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizadas para remoção de acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Química Nova**, 29 (1): 34-39.
- LAVERTU, M., Xia, Z., SERREQI, A.N., BERRADA, M., RODRIGUES, A., WANG, D., BUSCHMANN, M.D., Gupta, A. 2003. A validated <sup>1</sup>H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 32: 1149-1158.
- LI, Y.Q., WANG, Y., PENG, L.J., ZHANG, D.H. 2015. Lipase immobilization on epoxy-activated poly (vinylacetate-acrylamide) microspheres. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 129: 206–210.
- LIESE, A.; HILTERHAUS, L. 2013. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chem Soc Rev.**7: 6203–6568.
- LOZANO, S. V., GALLEGO, F. L., DUHALT, R. V., MATEOS-DÍAZ, J. C., GUISÁN, J. M., FAVELA-TORRES, E. 2014. Carrier-Free Immobilization of Lipase from *Candida rugosa* with Polyethyleneimines by Carboxyl-Activated Cross-Linking. **Biomacromolecules**. 15: 1896–1903.
- MAJED, N., GU, A. Z. 2010. Application of Raman Microscopy for Simultaneous and Quantitative Evaluation of Multiple Intracellular Polymers Dynamics Functionally Relevant to Enhanced Biological Phosphorus Removal Processes. **Environ. Sci. Technol.**, 44: 8601–8608.
- MAJUMDER, A. B., SINGH, B., DUTTA, D., SADHUKHAN, S., GUPTA, M. N. 2006. Lipase catalyzed synthesis of benzyl acetate in solvent-free medium using vinyl acetate as acyl donor. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, 16: 4041–4044.
- MALMIRI, H. J.; JAHANIAN, M. A. G.; BERENJIAN, A. 2012. Potential applications of chitosan nanoparticles as novel support in enzyme immobilization. **Am. J. Biochem. Biotechnol.**, 8: 203–219.

- MANOELA, E. A., Santos, J. C., Freired, D. M., Rueda, N., FERNANDEZ-LAFUENTE, R. 2015. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the open form of the enzyme. *Enzyme and Microbial Technology*, 71: 53–57.
- MANOEL, E. A., RIBEIRO, M. F.P., SANTOS, J. C. S., COELHO, M. A. Z., SIMAS, A.B.C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., FREIRE, D. M.G. 2015. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from Burkholderia cepacia: Application to the kinetic resolution. *Process Biochemistry*, 2015: 1–39.
- MATEO, C., PALOMO, J. M., FERNÁNDEZ-LORENTE, G., GUISAN, J. M., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. 2007. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme Microb. Technol.*, 40: 1451–1463.
- MAZUMDER, M.A.J. 2014. Polyelectrolyte complexation between cationic and anionic polyelectrolytes with complementary polymer-bound reactive groups of amine and acetoacetate: effect of mono- and divalent salts. *Iran Polym J.*, 23:445–455.
- MENGER, F.M., BRIDGET M., SYKES, B.M. 1998. Anatomy of a Coacervate. *Langmuir*. 14: 4131-4137.
- MENGER, F.M.; PERESYPKIN, A.V.; CARAN, K.L.; APKARIAN, R.P. 2000. A Sponge Morphology in an Elementary Coacervate. *Langmuir*, 16: 9113-9116.
- MEZTLER, P.S., FAIT, M.E., FOREST, M.L., MORCELLE, S.R. 2014. Biocatalytic characterization of a naturally immobilized lipase found in Araujia sericifera Brot. (Apocynaceae) látex. *Catal. Sci. Technol.*, 4: 1386–1394.
- MOMENI, A., FILIAGGI, M. J. 2013. Synthesis and characterization of different chain length. *Journal of Non-Crystalline Solids*, 382: 11-17.
- MOMENI, A.; FILIAGGI, M.J. 2014. Comprehensive Study of the Chelation and Coacervation of Alkaline Earth Metals in the Presence of Sodium Polyphosphate Solution. *Langmuir*, 30: 5256–5266.
- MOMENI, A., FILIAGGI, M. J. 2016. Degradation and hemostatic properties of polyphosphate coacervates. *Acta Biomaterialia*, 41: 328–341.



- MONDAL, S., LI, C., WANG, K. 2015. Bovine Serum Albumin Adsorption on Gluteraldehyde Cross-Linked Chitosan Hydrogels. ***Journal of chemical engineering data***, 60: 2356–2362.
- MOMENI, A., FILIAGGI, M. J. 2014. Comprehensive study of the chelation and coacervation of alkaline earth metals in the presence of sodium polyphosphate solution. ***Langmuir***, 30: 5256–5266.
- MU, B., LIU, P., LI, X., DU, P., DONG, Y., WANG, Y. 2012. Fabrication of flocculation-resistant pH/ionic strength/temperature multiresponsive hollow microspheres and their controlled release. ***Mol. Pharmaceutics***, 2012: 91–101.
- NOÛE, J de L., SCOTT, C.D.S.L., VANDENBERG, G.W. 2001. Factors affecting protein release from alginate–chitosan coacervate microcapsules during production and gastric / intestinal simulation. ***Journal of Controlled Release***, 77: 297–307.
- OLIVEIRA, M.M. Obtenção de isotermas de troca iônica de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  em vermiculita e suas caracterizações. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB, 2008.
- OZYILMAZ, E., SAYIN, S. 2013. Preparation of New Calix[4]arene-Immobilized Biopolymers for Enhancing Catalytic Properties of *Candida rugosa* Lipase by Sol–Gel Encapsulation. ***Appl Biochem Biotechnol.***, 170:1871–1884.
- OGAWA, K. 2015. Effects of salt on intermolecular polyelectrolyte complexes formation between cationic microgel and polyanion. ***Advances in Colloid and Interface Science***, 226: 115–121.
- PALAVIT, G.; MONTAGNE, L.; DELAVAL, R. 1995. Preparation of zinc-sodium phosphate glass precursors by coacervation. ***Journal of non-crystalline solids***, 189: 277-282.
- PIACENTINI, E., YAN, M., GIORNO, L. 2017. Development of enzyme-loaded PVA microspheres by membrane emulsification. ***J. Memb. Sci.***, 524: 79–86.
- PICKUP, D.M.; NEWPORT, R.J.; BARNEY, E.R.; KIM, J.Y.; VALAPPIL, S.P.; KNOWLES, J.C. 2014. Characterisation of phosphate coacervates for potential biomedical applications. ***Journal of Biomaterials Applications***, 28(8): 1226–1234.

PRIFTIS, D., MEGLEY, K., LAUGEL, N., TIRRELI, M. 2013. Complex coacervation of poly (ethylene-imine)/polypeptide aqueous solutions: Thermodynamic and rheological characterization. ***Journal of Colloid and Interface Science***, 398: 39–50.

QIN, J., PRIFTIS, D., FARINA, R., PERRY, S.L., LEON, L., WHITMER, J., HOFFMANN, K., TIRRELL, M., PABLO, J.J. 2014. Interfacial Tension of Polyelectrolyte Complex Coacervate Phases. ***ACS Macro Letters***, 3: 565–568.

QIN, Z.; Li, D.; YANG, R. 2016. Study on inorganic modified ammonium polyphosphate with precipitation method and its effect in flame retardant polypropylene. ***Polymer Degradation and Stability***, 126: 117-124.

RAHMOUNI, N.T., BENSIRADJ, N.H., DJEBBAR, S., BAITICH, O.B. 2014. Synthesis, characterization, electrochemical studies and DFT calculations of amino acids ternary complexes of copper (II) with isonitrosoacetophenone. Biological activities. ***Journal of Molecular Structure***, 1075: 254–263.

RAMIREZ, H.L., BRIZUELA, L.G., IRANZO, J.U., VILLENA, M.A., Pérez, A.I.B. 2016. Pectinase immobilization on a chitosan-coated chitin support. ***Journal of food Process Engineering***, 39: 97-104.

RAMIREZ, H. L., GÓMEZ BRIZUELA, L., ÚBEDA IRANZO, J., AREVALO-VILLENA, M., BRIONES PÉREZ, A. I. 2016. Pectinase Immobilization on a Chitosan-Coated Chitin Support. ***J. Food Process Eng.***, 39: 97–104.

RATTANAPHRA, D., SRINOPHAKUN, P. 2010. Biodiesel Production from Crude Sunflower Oil and Crude Jatropha Oil Using Immobilized Lipase Biodiesel Production from Crude Sunflower Oil and Crude Jatropha. ***J. Chem. Eng. Japan***, 43: 104–108.

RODRIGUES, D. S., MENDES, A. A., ADRIANO, W. S., GONÇALVES, L. R. B., GIORDANO, R. L. C. 2008. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. ***J. Mol. Catal. B: Enzym.***, 51: 100–109.

RODRIGUES, R.C., ORTIZ, C., BERENGUER-Murcia, A., TORRES, R., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. 2013. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. ***Chem Soc Rev.***, 2012. 42(15), 6290-307.

- RU, Q.; WANG, Y.; LEE, J.; DING, Y.; HUANG, Q. 2012. Turbidity and rheological properties of bovine serum albumin/pectin coacervates: Effect of salt concentration and initial protein/polysaccharide ratio. ***Carbohydrate Polymers***, 88: 838– 846.
- RUEDA, N., ALBUQUERQUE, T. L., BARTOLOME-CABRERO, R., BARBOSA, O., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. 2016. Reversible Immobilization of Lipases on Heterofunctional Octyl-Amino Agarose Beads. ***Molecules***, 21, 646: 1-18.
- RULLIERE, C., PERENES, L., SENOCQ, D., DODI, A., MARCHESSEAU, S. 2012. Heat treatment effect on polyphosphate chain length in aqueous. ***Food Chemistry***, 134: 712–716.
- SADANA, A., HENLEY, J. P. 1987. Analysis of Enzyme Deactivations by a Series-Type Mechanism: Influence of Modification on the Activity and Stability of Enzymes. ***Ann. N. Y. Acad. Sci.***, 501: 73–79.
- SIQUEIRA, N.M., GARCIA, K.C., BUSSAMARA, R., BOTH, F.S., VAINSTEIN, M.H., SOARES, R.M.D. 2015. Poly (lactic acid)/chitosan fiber mats: Investigation of effects of the support on lipase immobilization. ***International Journal of Biological Macromolecules***. 72: 998–1004.
- SPRUIJT, E., LEERMAKERS, F. A. M., FOKKINK, R., SCHWEINS, R., VAN WELL, A. A., STUART, M. A.C., VAN DER GUCHT, J. 2013. Structure and dynamics of polyelectrolyte complex coacervates studied by scattering of neutrons, X-rays, and light. ***Macromolecules***. 46: 4596–4605.
- SAEED FARROKHPAY, S.; MORRIS, G.E.; BRITCHER, L.G. 2012. Stability of sodium polyphosphate dispersants in mineral processing applications. ***Minerals Engineering***, 39: 39–44.
- SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y.J. 1999. Food applications of chitin and chitosans. ***Trends Food Sci. Technol.***, 10: 37–51.
- SCHILKE, K.F., KELLY, C. 2008. Activation of Immobilized Lipase in Non-Aqueous Systems by Hydrophobic Poly-DL-Tryptophan Tethers. ***Biotechnology and Bioengineering***, 101: 9-18.

SHELDON, R. A., PELT, S.V. 2013. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chem Soc Rev.**, 42: 6250-6261.

SHRIVER, D.F.; ATKINS, P.W. 2003. Química Inorgânica, 3ª ed., Porto Alegre, **Bookman**.

SHUKLA, S.K., MISHRA, A.K., AROTIBA, O.A., MAMBA, B.B. 2013. Review - Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 59: 46– 58.

SILVA, M.A.P., FRANCO, D.F., BRANDÃO, A.R.; BARUD, H., DIAS FILHO, F.A., RIBEIRO, S.J.L., MESSADDEQ, Y., OLIVEIRA, L.F.C. 2010. Spectroscopic studies on glassy Ni(II) and Co(II) polyphosphate coacervates. **Materials Chemistry and Physics**, 124: 547–551.

SINHA, V.R. SINGLA, A.K., WADHAWAN, S., KAUSHIK, R., KUMRIA, R. BANSAL, K., DHAWAN, S. 2004. Review- Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, 274:1–33.

SIQUEIRA, N. M., GARCIA, K. C., BUSSAMARA, R., BOTH, F. S., VAINSTEIN, M. H., SOARES, R. M. D. 2015. Poly (lactic acid)/chitosan fiber mats: Investigation of effects of the support on lipase immobilization. **Int. J. Biol. Macromolecules**, 72: 998–1004.

SUN, G., ZHANG, Z. 2002. Mechanical strength of microcapsules made of different wall materials. **International Journal of Pharmaceutics**, 242: 307–311.

SZUMERA, M.; WACŁAWSKA, I.; SUŁOWSKA, J. 2016. Influence of CuO and ZnO addition on the multicomponent phosphate glasses: Spectroscopic studies. **Journal of Molecular Structure**, 1114: 78-83.

TEIXEIRA, R., LOURENÇO, N. M. T. 2014. Enzymatic kinetic resolution of sec-alcohols using an ionic liquid anhydride as acylating agent. **Tetrahedron: Asymmetry**, 25: 944-948.

THAKUR, V.K., THAKUR, M.K. 2014. Recent Advances in Graft Copolymerization and Applications of Chitosan: A Review. **Sustainable Chemistry and Engineering**, 2: 2637–2652.

- TIMILSENA, Y.P., ADHIKARI, R., BARROW, C.J., ADHIKARI, B. 2016. Microencapsulation of chia seed protein proteinisolate-chia seed gum complex coacervates. *International Journal of Biological Macromolecules*, 91: 347-357.
- TRZCIŃSKA, M., SIELIWANOWICZ, B., HAŁASINSKA, A.G., CZUPRYŃSKI, B. 2007. Application of physicochemically modified polymeric foil to develop antioxidante packaging. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57 (2): 173–176.
- VAN DER GUCHT, J., SPRUIJT, E., LEMMERS, M., STUART, M.A.C. 2011. Polyelectrolyte complexes: Bulk phases and colloidal systems. *Journal of Colloid and Interface Science*, 361: 407–422.
- VANERЕК, A., VAN DE VEM, T.G.M. 2005. Coacervate complex formation between cationic polyacrylamide and anionic sulfonated kraft lignin. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 273: 55–62.
- VELASCO-LOZANO, S., LÓPEZ-GALLEGO, F., VÁZQUEZ-DUHALT, R., MATEOS-DÍAZ, J. C., GUISÁN, J. M., FAVELA-TORRES, E. 2014. Carrier-free immobilization of lipase from *Candida rugosa* with polyethyleneimines by carboxyl-activated cross-linking. *Biomacromolecules*, 15: 1896–1903.
- VILLALBA, M., Verdasco-Martín, C. M., Santos, J. C. S., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R., OTERO, C. 2016. Operational stabilities of different chemical derivatives of Novozym 435 in an alcoholysis reaction. *Enzyme Microb. Technol.*, 90: 35–44.
- VRIES, R.; STUART, M.C. 2006. Theory and simulations of macroion complexation. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 11: 295–301.
- WAN, B., YAN, Y., TANG, Y., BAI, Y., LIU, F., TAN, W., HUANG, Q., FENG, X. 2017. Effects of polyphosphates and orthophosphate on the dissolution and transformation of ZnO nanoparticles. *Chemosphere*, 176: 255–265.
- WANG, Q., SCHLENOFF, J.B. 2014. The Polyelectrolyte Complex/Coacervate Continuum. *Macromolecules*, 47: 3108–3116.
- WANG, J., ZHAO, G., JING, L., PENG, X., LI, Y. 2015. Facile self-assembly of magnetite nanoparticles on three-dimensional graphene oxide–chitosan composite for lipase immobilization. *Biochemical Engineering Journal*, 98: 75–83.

WANG, X., HUANG, J., WANG, K., NEUFURTH, M., SCHRÖDER, H.C., WANG, S., MÜLLER, W.E.G. 2016. The morphogenetically active polymer, inorganic polyphosphate complexed with  $GdCl_3$ , as an inducer of hydroxyapatite formation in vitro. *Biochemical Pharmacology*, 102: 97-106.

WANG, J., ZHAO, G. YU, F. 2016. Facile preparation of  $Fe_3O_4@MOF$  core-shell microspheres for lipase immobilization. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 69: 139–145.

WEN, Y., GRØNDAHL, L., GALLEGRO, M.R., JORGENSEN, L., MØLLER, E.H., NIELSEN, H.M. 2012. Delivery of dermatan sulfate from polyelectrolyte complex-containing alginate composite microspheres for tissue regeneration. *Biomacromolecules*, 13: 905–917.

WILLOT, G., GOMEZ, F., VAST, P., ANDRIES, V., MARTINES, M., MESSADDEQ, Y., POULAIN, M. 2002. Preparation of zinc sodium polyphosphates glasses from coacervates precursors. Characterisation of the obtained glasses, and their applications. *C. R. Chimie*, 5: 899–906.

WILSON, L., LLLANES, A., ABIÁN, O., PESSELA, B. C. C., FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M. 2004. Co-Aggregation of Penicillin G Acylase and Polyionic Polymers: An Easy Methodology to Prepare Enzyme Biocatalysts Stable in Organic Media. *Biomacromolecules*, 5: 852–857.

YANG, A. H., DENG, C., CHEN, H., WEI, Y. X., WANG, Y. Z. 2017. A novel Schiff-base polyphosphate ester: Highly-efficient flame retardant for polyurethane elastomer. *Polym. Degrad. Stab.* 144: 70-82.

PANDYA, Y., KNORR, D. 1991. Diffusion Characteristics and Properties of Chitosan Coacervate Capsules. *Process Biochemistry*. 26: 75-81.

YUCE-DURŞUN, B., CIGIL, A. B., DONGEZ, D., KAHRAMAN, M. V., OGAN, A., DEMIR, S. 2016. Preparation and characterization of sol-gel hybrid coating films for covalent immobilization of lipase enzyme. *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 127: 18–25.

ZAJĄC, A., HANUZA, J., WANDAS, M., DYMIŃSKA, L. 2015. Determination of N-acetylation degree in chitosan using Raman spectroscopy. ***Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy***, 134: 114–120.

ZDARTA, J.; NORMAN, M.; SMUŁEK, W.; MOSZYŃSKI, D.; KACZOREK, E.; STELLING, A.L.; EHRLICH, H.; JESIONOWSKI, T. 2017. Spongin-Based Scaffolds from *Hippospongia communis* Demosponge as an Effective Support. ***Catalysts***, 7: 1–20.

ZHAO, X., LIU, P. 2014. pH - sensitive fluorescent hepatocyte-targeting multilayer polyelectrolyte hollow microspheres as a smart drug delivery system. ***Molecular Pharmaceutics***, 11: 1599–1610.

ZHANG, D.H., YUWEN, L.X., PENG, L.J. 2013. Review Article - Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. ***Journal of Chemistry***, 2013: 1-8.

ZHENG, E., DANG, Q., LIU, C., FAN, B., YAN, J., YU, Z., ZHANG, H. 2010. Preparation and evaluation of adipic acid dihydrazide cross-linked carboxymethyl chitosan microspheres for copper ion adsorption. ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, 502: 34-43.

ZHU, X., ZHOU, T., WU, X., CAI, Y., YAO, D., XIE, C., LIU, D. 2011. Covalent immobilization of enzymes within micro-aqueous organic media. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***, 72: 145–149.