

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENADORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MATERIAIS

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLISSULFONA PARA A
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

JADISON FABRICIO DE SOUZA

CAXIAS DO SUL, 2006

JADISON FABRICIO DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Materiais da Universidade De Caxias do Sul,
visando à obtenção do grau de Mestre em materiais.
Orientador: Prof. Dr. Raul Alberto Riveros Gonzáles
Co-orientadora: Profa. Dra. Mara Zeni Andrade

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLISSULFONA PARA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

Caxias do Sul
2006

JADISON FABRICIO DE SOUZA

DESENVOLVIMENTO DE MEMBRANAS DE POLISSULFONA PARA
IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado
em Materiais da Universidade De Caxias do Sul,
visando à obtenção do grau de Mestre em materiais.
Orientador: Prof. Dr. Raul Alberto Riveros Gonzáles
Co-orientadora: Profa. Dra. Mara Zeni Andrade

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 23 DE AGOSTO DE 2006.

Prof. Dr. Raul Alberto Riveros Gonzalez
Orientador

Profa. Dra. Mara Zeni Andrade
Co-orientadora

Profa. Dra. Isabel Cristina Tessaro
Examinadora I

Prof. Dr. Maurício Moura da Silveira
Examinador II

Prof. Dr. Ademir José Zattera
Examinador III

À minha esposa Gisela e meu filho Bruno, que sempre estiveram ao meu lado nos momentos que mais precisei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado todas as oportunidades para a realização deste trabalho.

À minha família, por sempre estar ao meu lado.

Ao Prof. Dr. Raul Riveros, meu orientador e amigo, por ter aberto os meus olhos para o mundo da pesquisa. Fico triste por você não poder estar presente para ver o resultado final de nosso trabalho.

À Prof^a Dr^a Mara Zeni incentivadora do meu trabalho, por todas as dicas e cobranças, sem elas este trabalho não seria possível.

À Kátia Rasesa e Kátia Mello, pelos momentos de descontração, por todas as colaborações e principalmente pela amizade.

À Eliane Ferrarini, minha bolsista e amiga, por todo o auxílio e por todas as horas de estudos, trabalhos e discussões que tivemos.

À Prof^a Dr^a Maria da Graça Nascimento por ceder a enzima e pelas dicas, sempre úteis para a continuidade do trabalho.

À Prof^a Dr^a Kátia Tanous (UNICAMP) pela realização das medidas de porosidade.

Às técnicas do Laboratório de Química (Rose, Sonia e Fabíola) e aos bolsistas do LQUI, por todos os momentos que estivemos juntos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão de Bolsa de Mestrado

À todos que de alguma forma colaboraram para a realização deste trabalho, o meu agradecimento.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS.....	9
LISTA DE TABELAS.....	10
LISTA DE FIGURAS.....	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS.....	16
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	19
1. INTRODUÇÃO.....	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	22
2.1 Membranas Poliméricas	22
2.1.1 Métodos de preparação de membranas poliméricas.....	24
2.1.1.2 Inversão de Fase.....	24
2.1.2 Métodos de caracterização de membranas.....	27
2.1.3 Processos de separação por membranas.....	29
2.3.3.1 Eletrodialise.....	31
2.1.3.2 Membranas para Eletrodialise.....	32
2.2 Polissulfona.....	33
2.2.1 Membranas de polissulfona.....	34
2.5 Enantiômeros.....	35
2.3.1 Técnicas para Separação de Enantiômeros.....	36
2.3.1.1 Separação de enantiômeros utilizando membranas.....	38
2.3.1.2 Membranas polimérica enantiosseletivas.....	39
2.4 Enzimas.....	40
2.4.1 Lipases.....	41
2.6.2 Imobilização de enzimas.....	42
2.5.1 Imobilização por ligação covalente.....	45
2.7 Propranolol.....	46
2.7.1 Separação enantiomérica do propranolol por membranas.....	48
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	49

3.1 Materiais.....	49
3.1.1 Polissulfona.....	49
3.1.2 Membranas Comerciais.....	51
3.1.3 Enzima.....	52
3.1.4 Soluções.....	52
3.1.4.1 Tampão	52
3.1.4.2 Solução enzimática.....	52
3.1.4.3 Reagente de Bradford.....	53
3.1.4.4 Solução de acetato de p-nitrofenila e Triton X-100.....	53
3.2 Métodos	54
3.2.1 Análise de infravermelho FTIR.....	54
3.2.2 Preparação das soluções de PSU.....	54
3.2.3 Determinação do tempo de evaporação do solvente, condições de secagem, condições de tratamento térmico e espessura das membranas de PSU.....	55
3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	55
3.2.5 Capacidade de troca iônica.....	56
3.2.6 Capacidade de adsorção de água.....	56
3.2.7 Resistência Aparente do Sistema.....	57
3.2.8 Seletividade à permeação (permeseletividade).....	58
3.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC).....	60
3.2.10 Análise termogravimétrica (TGA).....	60
3.2.11 Porosidade.....	60
3.2.12 Imobilização da lipase.....	61
3.2.13 Determinação da quantidade de proteína imobilizada.....	61
3.2.14 Determinação dos parâmetros cinéticos.....	62
3.2.15 Atividade enzimática para a enzima livre.....	63
3.2.16 Análise de dados.....	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
4.1 Análise térmica da polissulfona.....	64

4.2 Caracterização química da polissulfona.....	67
4.3 Viscosidade e Tensão Superficial das soluções de PSU.....	68
4.4 Tempo de evaporação do solvente.....	70
4.5 Condições de secagem.....	72
A.....	75
B.....	75
B.....	78
4.6 Determinação das condições de tratamento térmico.....	82
4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	90
4.7 Espessura das membranas.....	91
4.8 Capacidade de troca iônica.....	92
4.9 Capacidade de adsorção de água	93
4.10 Seletividade à permeação (permesseletividade).....	94
4.11 Resistência aparente do sistema.....	96
4.12 Porosidade.....	99
4.13 Caracterização de enzima livre.....	103
4.14 Imobilização da enzima.....	106
4.15 Atividade enzimática.....	110
5 CONCLUSÕES.....	111
6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE.....	114
7 BIBLIOGRAFIA.....	115
ANEXO – TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSO.....	123

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Materiais típicos para produção de membranas[1].....	23@~
Quadro 2: Preparação de membranas por inversão de fase[4].....	27@~
Quadro 3: Caracterização dos processo de separação por membranas[1].....	29@~
Quadro 4 : Comparação entre os diferentes métodos de imobilização de enzimas[47]	
.....	43@~

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 : Características da PSU comercial (Cas number 25135-51-7, MDL number MFCD00134387 da Sigma-Aldrich Company).....	49@~
Tabela 2: Características das membranas comerciais Selemion® CMT e CMV produzidas pela Asahi Glass Company[71].....	51@~

Tabela 3: Volumes utilizados na reação para determinação da quantidade de enzima imobilizada.....	62@~
Tabela 4: Volumes utilizados para a reação de hidrólise do PNPA e determinação da atividade enzimática para a enzima livre.....	63@~
Tabela 5 : Análises de TGA dos pellets e membranas de PSU.....	79@~
Tabela 6: Análises de DSC dos pellets e membranas de PSU.....	81@~
Tabela 7 : Análises térmicas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico a 150°C.....	86@~
Tabela 8: Temperatura de transição vítrea obtidas pela análise de DSC dos pellets e das membranas de PSU após tratamento térmico a 150°C.....	89@~
Tabela 9: Valores para a capacidade de adsorção de água e capacidade de troca iônica das membranas de polissulfona PSU2, PSU3 e PSU4 e das membranas comerciais Selemion® CMV e CMT.....	93@~
Tabela 10: Propriedades dos filmes de PSU obtidas por porosimetria de mercúrio	102@~
Tabela 11: Medidas da atividade enzimática para a lipase PS imobilizada nas membranas de polissulfona PSU2.....	111@~

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática de membranas com diferentes morfologias: A) membranas porosas e não porosas; B) membranas porosas simétricas e assimétricas[4]	24@~
Figura 2: Diagrama de fase esquemático do processo de inversão de fase[4].....	26@~
Figura 3: Princípio da transferência iônica no processo de ED[8].....	32@~
Figura 4: Estrutura molecular da PSU.....	34@~
Figura 5: Técnicas utilizada para separação de enantiômeros[28].....	38@~
Figura 6: Estruturas dos aminoácidos presentes no sítio catalítico da lipase.....	42@~
Figura 7 : Classificação dos métodos de imobilização de enzimas[51].....	45@~
Figura 8: Estrutura molecular dos enantiômeros do fármaco propranolol[66].....	47@~
Figura 9: Pellets de polissulfona (Sigma-Aldrich Company).....	51@~
Figura 10: Montagem do sistema de ED para determinação da resistência aparente. A) sistema para determinação da resistência aparente; B) detalhe da cela de ED com eletrodos de prata-cloreto de prata[4,8].....	57@~
Figura 11: Fonte e eletrodos de platina do sistema de ED.....	58@~
Figura 12: Cela de eletrodialise com dois compartimentos.....	60@~
Figura 13: Termograma de TGA dos pellets de PSU (taxa de aquecimento 10°C.min-1, em N2, de 0°C a 800°C).....	65@~
Figura 14: Termograma de DSC dos pellets de PSU (taxa de aquecimento 10°C.min-1, em N2, de 0°C a 300°C).....	66@~
Figura 15: Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos pellets de PSU em KBr e dos filmes de PSU, após inversão de fase.....	67@~

Figura 16 : Relação entre a viscosidade e a tensão superficial das soluções de PSU em clorofórmio com diferentes concentrações do polímero.....	69@~
Figura 17: Relação entre o tempo e a perda de massa do solvente (clorofórmio), nas soluções de PSU, antes da inversão de fase (25°C e 65% de umidade)	71@~
Figura 18: Termograma de TGA das membranas de PSU após inversão de fase em água (taxa de aquecimento 10°C.min-1, em N2, de 0°C a 800°C).....	73@~
Figura 19: Termograma de DSC das membranas de PSU após inversão de fase em água (taxa de aquecimento 10 °C.min-1, em N2, de 0°C a 300°C).....	74@~
Figura 20: Perda de massa das membranas obtidas por inversão de fase após secagem em estufa a 80°C A) PSU2, B)PSU3 e C) PSU4.....	76@~
Figura 21:Velocidade de perda de massa das membranas obtidas por inversão de fase após secagem em estufa a 80°C A) PSU2, B) PSU3 e C) PSU4.....	78@~
Figura 22: Termogramas de TGA das membranas de polissulfona (taxa de aquecimento 10 °C.min-1, em N2, de 0°C a 800°C). A) secagem por 4h, B) secagem por 8h e C) secagem por 12h.....	79@~
Figura 23: Termograma de DSC para as membranas de PSU secas em estufa a 80°C com diferentes tempos de secagem (taxa de aquecimento 10 °C.min-1, em N2, de 0°C a 300°C).....	81@~
Figura 24: Termograma de DSC dos pellets de PSU, da membrana de PSU após a inversão de fase e das membranas secas em estufa a 80°C durante 8h (taxa de aquecimento 10 °C.min-1, em N2, de 0°C a 300°C).....	81@~
Figura 25: Termogramas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 30 minutos (taxa de aquecimento 10 °C.min-1, em N2, de 0°C a 800°C). A) membrana PSU2; B) membrana PSU3 e C) membrana PSU4.....	84@~

Figura 26: Termogramas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 1 hora (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 800°C). A) membrana PSU2; B) membrana PSU3 e C) membrana PSU4.....	85@~
Figura 27: Termogramas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 2 horas (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 800°C). A) membrana PSU2; B) membrana PSU3 e C) membrana PSU4.....	86@~
Figura 28: Membrana de PSU obtida por inversão de fase, após o tratamento térmico a 150°C.....	87@~
Figura 29 Termograma de DSC dos pellets e membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 2 horas (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 300°C.....	88@~
Figura 30: Defeitos apresentados por algumas membranas de PSU após o tratamento térmico a 150°C.....	89@~
Figura 31: Micrografias obtidas em MEV da superfície dos filmes de PSU com ampliação de A) 500X e B)3000X.....	91@~
Figura 32: Micrografias obtidas em MEV da secção transversal dos filmes de PSU obtidos por inversão de fase e fraturados criogenicamente com N₂ líquido. Ampliação de: A) 500X e B) 5000X	91@~
Figura 33: Capacidade de troca iônica das membranas de polissulfona PSU2, PSU3 e PSU4 e membranas comerciais de eletrodialise Selemion® CMV e CMT.....	93@~
Figura 34: Permessetividade das membranas de PSU e das membranas comerciais Selemion® CMV e CMT (solução de KCl).....	95@~
Figura 35: Resistência elétrica do sistema (cela) de ED de dois compartimento, sem membranas.....	97@~

Figura 36: Resistência elétrica das membranas de PSU e das membranas comerciais CMT e CMV.....	97@~
Figura 37: Resistência aparente do sistema de ED: A) com membrana PSU2, B) com membrana PSU3, C) com membrana PSU4, D) com membrana CMV e E) com membrana CMT.....	98@~
Figura 38: Distribuição média de poros (%) versus diâmetro dos poros das membranas de polissulfona PSU2 (porosimetria de mercúrio).....	99@~
Figura 39: Distribuição média dos poros versus diâmetro dos poros das membranas de polissulfona PSU3 (porosimetria de mercúrio).....	100@~
Figura 40: Distribuição média dos poros versus diâmetro dos poros das membranas de polissulfona PSU4 (porosimetria de mercúrio).....	101@~
Figura 41: Reação de hidrólise do PNPA[63].....	103@~
Figura 42: Concentração do substrato (PNPA) versus velocidade de hidrólise do PNPA com lipase livre.....	104@~
Figura 43: Hidrólise do PNPA - Cinética para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis Menten.....	105@~
Figura 44: Curva de calibração para determinação da quantidade de lipase PS imobilizada em membranas de PSU (método de Bradford).....	107@~
Figura 45: Rendimento da reação de imobilização de lipase PS em filmes de PSU em diferentes tempos com temperatura de 25°C.....	108@~
Figura 46: Quantidade de lipase PS imobilizada nas membranas de PSU em diferentes tempos de imobilização.....	109@~

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AFM	Microscopia de força atômica
AMX	Membrana íon-seletiva da Tokuyama Soda Inc.
BSA	Serina albumina bovina
CMT	Membrana íon-seletiva Selemion® da Asahi Glass Co.
CMV	Membrana íon-seletiva Selemion® da Asahi Glass Co.
CMX	Membrana íon-seletiva da Tokuyama Soda Inc.
DSC	Calorimetria exploratória diferencial
DTG	Primeira derivada da análise termogravimétrica
ED	Eletrodiálise
FTIR	Infravermelho com transformada de Fourier
IV	Infravermelho
K_m	Constante de Michaelis-Menten
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MF	Microfiltração
M_w	Peso molecular médio
OR	Osmose reversa
PM10	Membrana de polissulfona Diaflo® da Amicon Corp.

PM30	Membrana de polissulfona Diaflo [®] da Amicon Corp.
PNPA	Acetato de p-nitrofenila
PSU	Polissulfona
PSU2	Membrana de polissulfona obtida a partir de 2mL de solução
PSU3	Membrana de polissulfona obtida a partir de 3mL de solução
PSU4	Membrana de polissulfona obtida a partir de 4mL de solução
PV	Pervaporação
PVP	Poli(vinilpirrolidona)
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Análise termogravimétrica
UF	Ultrafiltração
UV	Ultravioleta
$V_{\text{máx}}$	Velocidade máxima

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo a preparação e caracterização de membranas de polissulfona (PSU) e a imobilização da enzima lipase nestes filmes, para a produção de membranas enantiosseletivas, visando utilização futura em separação de misturas quirais.

Membranas de PSU foram preparadas pelo processo de inversão de fase, utilizando clorofórmio como solvente e água como agente coagulante para a inversão. Foram preparadas membranas com diferentes espessuras e os seguintes parâmetros para a inversão de fase foram

definidos: concentração das soluções, tempo de evaporação do solvente, secagem e tratamento térmico. As membranas foram caracterizadas, visando a utilização em processo de eletrodialise (ED) e imobilização da enzima lipase PS. Para a imobilização foi utilizado o glutaraldeído como agente bifuncional para ligação da enzima ao polímero. Na imobilização foram determinados os parâmetros cinéticos velocidade máxima (V_{\max}) e constante de Michaelis-Menten (K_m), a quantidade de enzima imobilizada nas membranas pelo método de Bradford e a atividade da enzima livre e imobilizada através da hidrólise do acetato de p-nitrofenila (PNPA). As membranas de PSU preparadas por inversão são hidrofóbicas, e apresentaram características de permeseletividade e capacidade de troca iônica inferiores às apresentadas pelas membranas comerciais Selemion[®] CMT e CMV e resistência elétrica superior à destas membranas. O diâmetro dos poros nas membranas é menor que 100 nm. . A quantidade máxima de enzima imobilizada foi de 2,35 mg .g⁻¹ de polímero em 18 horas de imobilização com um rendimento de 61,2%. A atividade da enzima decaiu após a imobilização, de 14780 U.g⁻¹ (enzima livre) para 1184 U.g⁻¹ (enzima imobilizada).

Palavras chave : eletrodialise; polissulfona; membrana íon-seletiva; inversão de fase; imobilização; lipase.

ABSTRACT

Preparation and characterization of polysulfone (PSU) membranes and the immobilization of lipase enzyme in these membranes to produce enantioselective membranes, in order to separate chiral compounds, is the subject of the present work.

PSU membranes were prepared by phase inversion, using chloroform as solvent and water as nonsolvent. Membranes with different thickness were prepared and phase inversion parameters such as (solution concentrations, solvent evaporation time, drying and thermal

treatment) were investigated. Membranes were characterized, in order to use them in electro dialysis process (ED) and in the lipase PS enzyme immobilization. For immobilization, bifunctional agent glutaraldehyde was used to link the enzyme to the polymer. On immobilization, the kinetic constants (K_m e V_{max}), the amount of immobilized enzyme with Bradford method and the activity of free and immobilized enzyme with p-nitrophenyl acetate (PNPA) hydrolysis, were determined. PSU membranes prepared by phase inversion are hydrophobic and, when compared with Selemion® CMT and CMV commercial membranes, present lower permselectivity, lower ion exchange capability and higher resistance. Membranes pore diameter is lower than 100 nm. The maximum amount of immobilized enzyme in the membranes reached 2.35 mg per gram of polymer after 18 hours of immobilization with a 61,2% yield. Enzyme activity decays after immobilization, from 14780 U.g⁻¹ (free enzyme) to 1184 U.g⁻¹ (immobilized enzyme).

Keywords : electro dialysis; polysulfone; ion exchange membranes; phase inversion; immobilization; lipase.

1. INTRODUÇÃO

Em consequência dos avanços tecnológicos ocorridos nos últimos trinta anos, os processos de separação por membranas têm-se tornado cada vez mais importantes, com aplicações nos mais diversos ramos da atividade industrial.^[1]

No início da década de 60 Loeb e Sourirajan obtiveram a primeira membrana assimétrica de acetato de celulose, utilizando o processo de inversão de fase, tornando possível a obtenção de um fluxo de permeado suficiente para viabilizar, economicamente, os processos de separação utilizando membranas.^[2]

Primeiramente, as membranas foram utilizadas para aplicações biomédicas (diálise) e produção de água potável (osmose reversa). Entretanto, com o desenvolvimento da Engenharia de Materiais, nos últimos 15 anos, ocorreu o incremento para outras aplicações industriais, entre elas a separação quiral.^[1,3]

Entre os processos de membranas utilizados para a separação quiral encontram-se a osmose reversa (OR), a ultrafiltração (UF) e a eletrodialise (ED).

A ED é um processo de separação por membranas, no qual íons são transportados através de membranas íon-seletivas, permeáveis a determinados cátions ou ânions. O transporte através das membranas íon-seletivas tem como força motriz o gradiente de potencial elétrico (dE/dx) através de membrana.^[1]

A separação de moléculas quirais vem despertando grande interesse industrial, pois a maioria das moléculas bioorgânicas são quirais. Apesar de muito parecidas, as substâncias quirais podem apresentar várias propriedades, como cheiro e sabor, além de diversas propriedades biológicas, completamente diferentes, tornando atrativo o isolamento destas substâncias para a produção de essências e medicamentos.^[3]

A partir da década de 90, foram desenvolvidas membranas poliméricas capazes de separar compostos enantioméricos acarretando um grande avanço nesta área, pois a separação por membranas apresenta menor custo, maior produtividade e fácil controle em relação aos métodos de separação tradicionais como cromatografia líquida e cromatografia gasosa.

O desenvolvimento na síntese de compostos enantiomericamente puros ou a separação de misturas racêmicas, passou a ter importância concreta para a indústria farmacêutica, visando a obtenção de medicamentos seletivos e a diminuição dos efeitos colaterais.

A tendência e a expansão crescente do mercado mundial de medicamentos quirais, está acarretando o desenvolvimento de novas técnicas que permitam uma maior produção para a obtenção de produtos estereoespecíficos, visando uma diminuição nos custos de

processo. Além disso, esses medicamentos seletivos permitem a redução da dosagem em relação a mistura racêmica.^[3,4]

O presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de membranas para a separação de fármacos quirais, por exemplo o propranolol (1-isopropilamino-3-(nafitiloxi)-2-propanol). Para isso foram preparadas membranas poliméricas de polissulfona (PSU) enantiosseletivas, através da imobilização de lipase PS sobre o substrato polimérico. Foram determinados vários parâmetros para a preparação do substrato de PSU por inversão de fase, tais como: evaporação de solvente, tempo de secagem, tratamento térmico, entre outros. Também foram definidos métodos e parâmetros para a imobilização da enzima tais como: método de imobilização; tempo de imobilização e atividade enzimática, visando maximizar a imobilização e evitar a perda na atividade da lipase imobilizada. Essas membranas foram caracterizadas para utilização no processo de eletrodialise e para separação quiral de fármacos como o propranolol.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Membranas Poliméricas

Membranas são barreiras seletivas ao transporte de matéria e energia, entre duas fases, sendo utilizadas em processos de separação, para o fracionamento, concentração e purificação dos componentes de uma mistura.^[1]

Em geral as membranas são classificadas em naturais e sintéticas. As membranas sintéticas podem ser orgânicas (líquidas ou poliméricas sólidas) ou inorgânicas. Essas membranas podem ser classificadas de acordo com o material do qual são produzidas.^[1]

No Quadro 1 são apresentados alguns materiais típicos para a produção de membranas poliméricas e membranas inorgânicas.

Quadro 1: Materiais típicos para produção de membranas^[1]

MEMBRANAS	
POLIMÉRICAS	INORGÂNICAS
Polissulfona	γ -Alumina/ α -Alumina
Poli(éter sulfona)	Borossilicato
Acetato de celulose	Carbono pirolizado
Celulose regenerada	Zircônio/Aço inoxidável
Poliamidas	Zircônio/Carbono
Poli(fluoreto de vinilideno)	
Poli(acrilato nitrila)	

As membranas poliméricas segundo a sua estrutura são simétricas ou assimétricas. As membranas simétricas podem ter poros cilíndricos, serem porosas ou não porosas (homogêneas). As membranas assimétricas possuem estrutura não uniforme e uma camada superficial fina (pele) ativa, suportada por uma estrutura porosa e são de três tipos: porosas, porosas com uma película fina e compósitas.

Na Figura 1 é apresentada uma representação esquemática da morfologia das membranas.

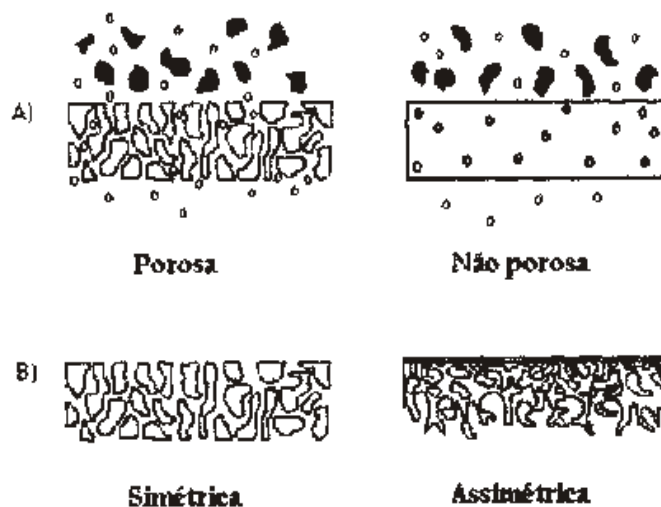


Figura 1: Representação esquemática de membranas com diferentes morfologias: A) membranas porosas e não porosas; B) membranas porosas simétricas e assimétricas^[4]

2.1.1 Métodos de preparação de membranas poliméricas

As membranas poliméricas podem ser produzidas por: sinterização ou produção de filmes flexíveis, para fabricação de membranas microporosas; espalhamento de solução (*casting*), para produção de membranas de troca iônica e membranas de pervaporação (PV); por inversão de fase, para fabricação de membranas porosas e membranas utilizadas em microfiltração (MF), ultrafiltração (UF) e diálise e extrusão para produção de membranas utilizadas em permeação de gases e PV.^[4,5]

Os métodos de sinterização e *casting* são utilizados para produção de membranas homogêneas densas e sem poros. Para a produção de membranas assimétricas porosas é utilizado o processo de inversão de fase, onde a porosidade pode ser variada pelo ajuste da composição da solução polimérica e pela seleção das condições do processo de precipitação.^[4]

As membranas de eletrodialise (ED) podem ser homogêneas ou heterogêneas, essas membranas são preparadas por polimerização iônica, ligação cruzada de polieletrólitos ou *casting*, onde podem ser mantidos trocadores iônicos (íon seletivos), ou utilizados polímeros com capacidade de condução iônica, como polissulfonas sulfonadas.^[5]

2.1.1.2 Inversão de Fase

A maioria das membranas poliméricas comerciais são produzidas por inversão de fase que é o processo no qual uma solução polimérica é precipitada em um líquido (ou gel) não

solvente^[3]. Membranas poliméricas são produzidas a partir de dois, três ou quatro componentes contidos em uma mistura, tais como: polímero, solvente, não solvente e em alguns casos um sal.^[5-7]

O processo de inversão de fase pode ocorrer por: evaporação do solvente em atmosfera inerte; evaporação controlada; resfriamento; inversão por precipitação em uma solução coagulante e evaporação a partir de fase vapor.^[3]

O método mais utilizado para inversão de fase é a inversão por precipitação em uma solução coagulante.^[4] Neste método, primeiro o polímero é dissolvido em um solvente apropriado, em muitos casos adicionam-se aditivos como poli(vinilpirrolidona) (PVP) para melhorar a distribuição de poros e interconectar os poros das várias camadas. Esta solução é espalhada em um suporte por uma faca de espalhamento.^[7] O suporte pode ser inerte, por exemplo uma placa de vidro; ou não inerte, por exemplo um polímero que irá servir de suporte final para a membrana como um poliéster não tecido. A espessura da camada espalhada varia de 50 μm a 500 μm . Após evaporação do solvente por um tempo determinado a solução é transferida para um banho com um não solvente para precipitação e irá ocorrer a troca entre o solvente e o não solvente (geralmente água) e a formação do filme polimérico por precipitação. O uso de um suporte inerte durante a inversão de fase é utilizado para produzir uma membrana livre, isto é, não suportada.^[7,8]

Na Figura 2 é apresentado um diagrama de fase esquemático do processo de inversão de fase.

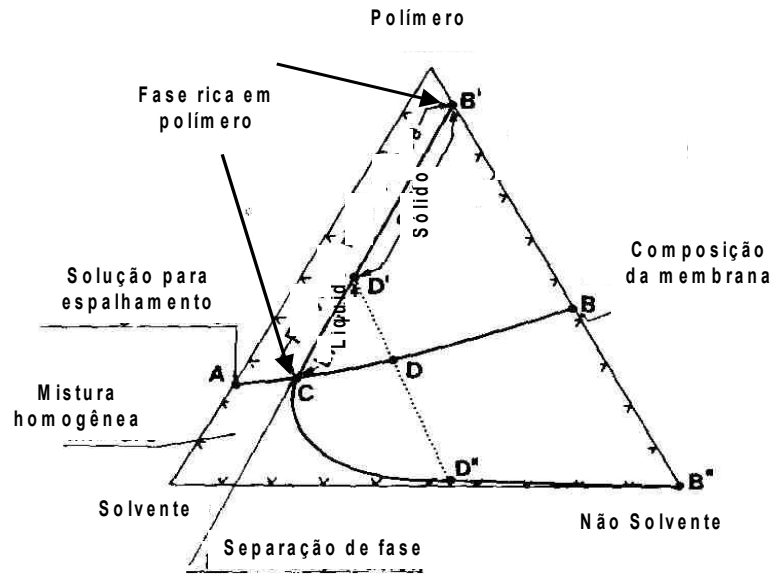


Figura 2: Diagrama de fase esquemático do processo de inversão de fase^[4]

Se um não solvente é adicionado a uma solução de polímero e solvente, conforme Figura 2, a composição desta solução é indicada por A; quando o solvente é removido da mistura, a composição passa de A para B e ocorre a formação da membrana por inversão da fase. No ponto C ocorre a coexistência de duas fases, uma fase rica em polímero e uma fase pobre em polímero. No ponto D inicia a formação da estrutura da membrana e as características finais da membrana produzidas podem ser determinadas com um certo grau de certeza.^[4]

As características de performance (seletividade e fluxo) das membranas produzidas por inversão de fase dependem de alguns dos parâmetros, como: concentração do polímero; tempo de evaporação antes da imersão no banho de precipitação; umidade; temperatura; composição da solução polimérica e composição e temperatura do banho de precipitação. [7]

No Quadro 2 são apresentados métodos utilizados para a preparação de membranas por inversão de fase.

Quadro 2: Preparação de membranas por inversão de fase^[4]

Método de Precipitação	Princípio
Evaporação do solvente em atmosfera inerte	Evaporação do solvente em atmosfera inerte, geralmente N ₂ , para produção de membranas densas.
Evaporação do Solvente em fase vapor	A solução é espalhada e exposta a um vapor saturado com solvente e não solvente. A membrana é formada pela penetração do não solvente na solução, produzindo uma membrana porosa.
Evaporação Controlada	O polímero é dissolvido em uma mistura de solvente e não solvente. Durante a evaporação do solvente a solução começa a ficar saturada de não solvente e inicia-se a precipitação e formação do filme ou membrana.
Precipitação Térmica	A solução polimérica é resfriada para provocar a separação das fases. A evaporação do solvente é responsável pela formação da membrana. Este método é utilizado geralmente para a preparação de membranas para MF.

2.1.2 Métodos de caracterização de membranas

Para ampliar e melhorar as aplicações dos processos com membranas, é imprescindível conhecer a relação entre a morfologia e as propriedades da membrana. Atualmente existem muitas técnicas e muitas variáveis, a partir das quais pode-se obter informações, tanto da morfologia das membranas como de seu comportamento e, conseqüentemente, pode-se relacionar as duas características. As técnicas de caracterização, geralmente são empregadas de maneira conjunta, visando determinar morfologia e comportamento das membranas.

Para caracterização de membranas íons seletivas, alguns parâmetros importantes devem ser determinados, como a performance elétrica, propriedades mecânicas, permeseletividade e estabilidade química.^[8]

As principais propriedades que devem ser determinadas em membranas íon-seletivas são:

- capacidade de troca iônica: determinada por titulação, visando quantificar os grupos trocadores de íons fixados na matriz polimérica. Park et al. (2005) avaliaram a capacidade de troca iônica de membranas de polissulfona (PSU) sulfonadas e obtiveram valores que variaram de 0,5 a 1,5 mmol.g⁻¹, quantidade essa que representa a presença de íons SO₃⁻ na matriz polimérica;^[9]
- permeseletividade: para medir a transferência de cargas elétricas, por um contra íon específico em relação ao transporte de cargas através da membrana. Membranas comerciais CMX e AMX da Tokuyama Soda Inc. foram testadas por Krol J.J. (2004), e foi determinada a permeseletividade destas, para água do mar;^[8]
- resistência elétrica: para determinação do potencial ou densidade de corrente que deve ser aplicado para permitir o fluxo de íons através da membrana. Krol J.J. (2004) determinou a resistência elétrica de membranas CMX e AMX em solução 0,5 mol.L⁻¹ de NaCl, comparando com os dados fornecidos pelo fabricante;^[8]

- propriedades químicas e mecânicas: a estabilidade química da membrana é determinada pela exposição do material a várias soluções (ácidos, bases, etc) e determinação da resistência a estes agentes. As propriedades mecânicas que devem ser determinadas são: a espessura; estabilidade dimensional; capacidade de absorção de água (hidrofilia); resistência mecânica e permeabilidade.^[9]

Algumas outras técnicas como: microscopia eletrônica de varredura (MEV); microscopia eletrônica de transmissão (TEM); microscopia de força atômica (AFM); porosimetria de mercúrio; adsorção de gases, etc. também podem ser utilizadas para caracterização de outras propriedades, como a porosidade e o tamanho dos poros, e servir de informação complementar às propriedade essenciais das membranas íon-seletivas.^[8]

2.1.3 Processos de separação por membranas

Membranas são utilizadas em vários processos de separação: separação de misturas de gases e vapores; líquidos miscíveis; dispersões sólido/líquido, líquido/líquido e sólidos/solutos dissolvidos em líquidos.^[10]

As membranas são utilizadas em vários processos, sendo que cada um deles utiliza um determinado tipo de membrana. O transporte através da membrana é realizado pelo emprego de uma determinada força motriz sendo dependente do tipo de processo. No Quadro 3 são apresentados alguns processos que utilizam membranas, com a respectiva força motriz e as principais aplicações.

Quadro 3: Caracterização dos processo de separação por membranas^[1]

Processo	Tipo de membrana	Força motriz	Aplicações
Microfiltração	Simétrica e microporosa	Gradiente de	Clarificação, esterilização por

	assimétrica	pressão	filtração
Ultrafiltração	Microporosa assimétrica	Gradiente de pressão	Separação de soluções
Nanofiltração	Assimétrica	Gradiente de pressão	Separação de partículas orgânicas pequenas e separação de sais de soluções
Osmose reversa	Assimétrica, compósita com uma pele homogênea	Gradiente de pressão	Separação de micro solutos e sais de soluções
Permeação de gases	Assimétrica, compósita ou homogênea	Gradiente de pressão, gradiente de concentração	Separação de misturas gasosas
Diálise	Simétrica microporosa	Gradiente de concentração	Separação de micro solutos e sais de soluções macromoleculares
Pervaporação	Assimétrica, compósita não porosa	Gradiente de concentração, pressão de vapor	Separação de misturas de líquidos voláteis
Permeação de vapor	Compósita não porosa	Gradiente de concentração	Separação de vapores voláteis de gases e vapores
Destilação por membranas	Microporosa	Gradiente de temperatura	Separação de água de solutos não voláteis
Eletrodiálise	Troca iônica, homogênea ou polimérica microporosa	Gradiente de potencial elétrico	Separação de íons da água e de solutos não iônicos
Eletrofiltração	Microporosa carregada	Gradiente de potencial elétrico	Retirada de água de soluções e sólidos suspensos
Membranas líquidas	Microporosas, líquidas com um transportador	Gradiente de concentração, reação	Separação de íons e solutos de soluções aquosas

Os processos de separação com membranas apresentam uma série de vantagens em relação aos processos de separação tradicionais. São processos onde a separação ocorre, sem que haja mudança de fase, economizando energia, e as propriedades das membranas podem ser ajustadas de acordo com a aplicação em questão.^[10]

Com o avanço no desenvolvimento na área de membranas, cada vez mais se expande sua aplicação no meio industrial: setor petroquímico, químico, mineral, metalúrgico,

alimentos, biotecnologia, farmacêutico, eletrônico, etc. Os processos que utilizam membranas competem com os métodos clássicos de separação, como adsorção; extração por solvente e cristalização.^[11-13]

2.3.3.1 Eletrodialise

Eletrodialise (ED) é um processo onde íons são transportados através de uma membrana íon seletiva sobre a influência de um potencial elétrico.^[4] A natureza da força motriz torna a eletrodialise diferente dos outros processos como a permeação de gases, a osmose reversa e a filtração, onde a força motriz é o gradiente de potencial químico do processo de separação.

A eletrodialise é utilizada para remover íons de uma solução eletrolítica ou para concentrar esta solução. Quando uma solução eletrolítica é colocada em um sistema contendo pares de membranas íon-seletivas (catiônica e aniônica) alternados (figura 3) entre dois eletrodos e uma corrente elétrica é aplicada, os ânions são transportados para o compartimento com carga positiva (compartimento anódico) e os cátions para o compartimento com carga negativa (compartimento catódico). A membrana catiônica retém os ânions, permitindo o transporte de cátions e a membrana aniônica retém os cátions permitindo o transporte de ânions.^[8]

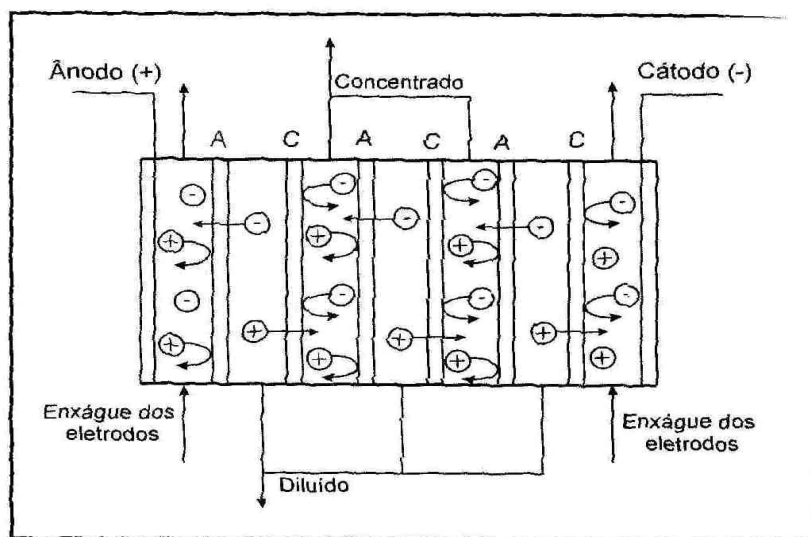


Figura 3: Princípio da transferência iônica no processo de ED^[8]

A principal aplicação da eletrodiálise consiste na produção de água potável a partir de água salobra. Este processo também é utilizado para tratamento de efluentes e na indústria de alimentos.^[12,13]

Estudos da utilização da técnica de eletrodiálise na indústria química e alimentícia têm sido desenvolvidos nos últimos anos. Uma das aplicações da técnica é na desmineralização do soro do leite.^[14] Outra aplicação na indústria alimentícia é na remoção do ácido tartárico do vinho.^[15]

Na indústria farmacêutica, a ED tem sido testada em escala de laboratório. Muitos desses estudos estão relacionados com a dessalinização de soluções contendo agentes ativos que têm que ser separados, purificados ou isolados de certos substratos e mais recentemente na separação de misturas racêmicas.^[15,16] Nestes casos a ED compete com outros processos de separação como a cristalização, a diálise e a extração por solventes.

2.1.3.2 Membranas para Eletrodiálise

As membranas íon-seletivas utilizadas em ED devem, essencialmente ter alta permeabilidade a cátions e ânions, possuir alta seletividade, baixa resistência elétrica e excelente propriedades químicas e mecânicas.^[13,16]

As propriedades das membranas íon-seletivas são determinadas pela matriz polimérica e pela espécie da substância fixada nesta matriz. A matriz polimérica é responsável pelas propriedades mecânicas, químicas e pela estabilidade térmica da membrana. Os polímeros utilizados como matriz para membranas íon-seletivas, são polímeros hidrofóbicos, como o poliestireno, polietileno e polissulfona. Estes polímeros são insolúveis em água e apresentam baixa hidrofília. Na superfície desses polímeros são introduzidos por ligação cruzada, grupos iônicos ou transportadores. O grau de ligações cruzadas entre o polímero e o grupo transportador terá grande efeito sobre as propriedades elétricas e sobre a seletividade da membrana.^[16]

Usualmente as membranas comerciais utilizadas em eletrodialise são fabricadas à base de copolímeros de poli[(estireno-co-(divinilbenzeno))] com um grupo trocador de íons, fixo ao anel de benzeno. A membrana catiônica, geralmente, possui grupos sulfonatos e a membrana aniônica possui grupos amônia quaternários, como trocadores iônicos.^[17]

Membranas íon-seletivas são aplicadas em vários processos como células combustível (conversão de energia química em energia elétrica)^[18], eletrólise por membranas (produção de cloreto e soda cáustica)^[19], diálise (recuperação de ácidos em misturas de sais e ácidos)^[20,21] e em eletrodialise.^[15,16,22]

2.2 Polissulfona

As polissulfonas (PSU) [poli(oxi-1,4-fenilenosulfonil)-1,4-fenilenooxi-1,4-fenileno (1-metiletilideno)-1,4-fenileno], são polímeros de características predominantemente amorfas em relação à estrutura cristalina. Apresentam elevada resistência química, resistindo aos ácidos, álcalis, soluções salinas, detergentes, óleos e álcoois. As PSU são atacadas por solventes orgânicos polares como cetonas, hidrocarbonetos halogenados e hidrocarbonetos aromáticos.^[23]

As PSU podem ser produzidas por uma reação nucleofílica de deslocamento ou por uma reação do tipo Friedel-Craftes utilizando cloretos de sulfonila.

Na figura 4 é apresentada a estrutura molecular da polissulfona.

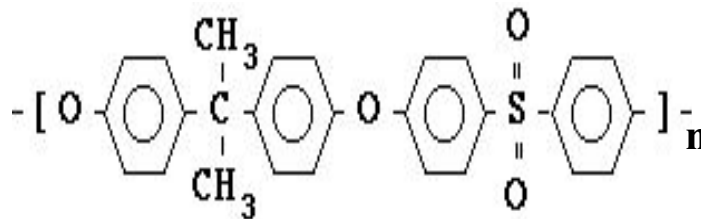


Figura 4: Estrutura molecular da PSU

A estrutura molecular da PSU é caracterizada pelo grupo diaril-sulfona. Este grupo tende a atrair elétrons para o anel aromático e oxigênio para o grupo sulfona e com essa ressonância determina ligações químicas muito fortes fixando especialmente grupos em uma configuração plana com o que o polímero tem excelente estabilidade térmica e rigidez a elevadas temperaturas.^[23]

2.2.1 Membranas de polissulfona

A escolha do material utilizado é fator primordial no desenvolvimento de membranas e diversos são os fatores que deverão ser levados em consideração numa seleção tais como: propriedades hidrofóbicas; propriedades hidrofílicas; resistência mecânica; resistência química; resistência térmica; capacidade de recuperação; estabilidade dimensional e custo.^[13,23]

Membranas de PSU podem ser utilizadas como suporte para preparação de membranas compósitas de poliamida^[24]; podem ser utilizadas para preparação de membranas carregadas, como as desenvolvidas por Ochoa e Marchese (2003), que prepararam membranas de PSU por inversão de fase incorporando resinas de troca iônica na solução polimérica^[25]; ou ainda utilizadas em ultrafiltração.^[26]

Membranas de PSU sulfonadas estão sendo utilizadas como alternativa na substituição de membranas comerciais como a Nafion[®] em processos de eletrodialise, por apresentarem excelente estabilidade térmica e mecânica e alta resistência a hidrólise e agentes oxidantes.^[9]

Dalla Costa *et. al.* estudaram o tratamento de um efluente galvânico contendo íons metálicos utilizando membranas Nafion 450 da DuPont obtendo recuperação de ferro, níquel, cobre e até 68% para íons alumínio do efluente.^[27]

2.5 Enantiômeros

Até o ano de 2005 mais de dois milhões de compostos orgânicos foram isolados no estado puro e caracterizados de acordo com suas propriedades físicas e químicas. Muitos desses compostos, apesar de apresentarem a mesma fórmula molecular possuem diferentes propriedades físicas e químicas; os quais são denominados isômeros. Estes, podem ser de diversos tipos: de cadeia, posição, geométricos ou óticos.^[28]

Na última metade do século XIX, Pasteur estudou pares de compostos que pareciam apresentar estrutura e propriedades físicas idênticas, mas que se diferenciavam apenas pelo fato de desviarem o plano de luz polarizada em um mesmo ângulo, embora em sentidos opostos. Tais pares de compostos receberam o nome de isômeros ópticos, sendo chamado de dextrógiro o isômero que desvia a luz polarizada para a direita e levógiro o isômero que desvia a luz polarizada para a esquerda.^[3,28]

Na metade do século XX, pesquisas levaram ao descobrimento que os diferentes tipos de enantiômeros (compostos que apresentam imagem especular não sobreponível um do outro), apresentam atividades biológicas distintas. Apesar de muito parecidas, as substâncias quirais, (que apresentam imagem especular não sobreponível) podem apresentar várias propriedades, como cheiro e sabor, além de diversas propriedades biológicas, completamente diferentes, tornando atrativo o isolamento das substâncias para a produção de essências e medicamentos.^[28]

2.3.1 Técnicas para Separação de Enantiômeros

A obtenção dos enantiômeros puros pode ser realizada por via quiral ou por via racêmica. A primeira está baseada no desenvolvimento de uma via enantiosseletiva para obtenção do enantiômero puro desejado; a segunda, na preparação de uma mistura racêmica (mistura enantiomérica) seguida da separação dos seus isômeros. Uma grande desvantagem da primeira via está no fato de geralmente apresentar baixa produtividade, além da geração de muitos subprodutos indesejáveis nas várias etapas do processo.^[3,29,30] Devido a este fato são desenvolvidas técnicas de separação de enantiômeros que permitam a obtenção dos compostos puros com alta produtividade. Estas técnicas de separação podem ser de dois tipos:

separação direta (separação dos próprios enantiômeros) ou separação indireta (formação e separação dos compostos).

Existem várias técnicas de separação de enantiômeros^[3,28,31,32], tais como:

- cristalização: utiliza-se este método para a purificação de compostos sólidos, separando impurezas e subprodutos. Esta técnica permite a separação direta ou indireta de enantiômeros. Para se obter o produto desejado, introduz-se cristais do enantiômero puro na mistura racêmica que se deseja separar, também pode-se utilizar um solvente ou uma solução quiral. A principal limitação desta técnica é a escassa disponibilidade de cristais de enantiômeros puros;
- técnicas cromatográficas: permitem a separação direta ou indireta de enantiômeros. A separação destes é obtida por consequência das diferentes afinidades dos enantiômeros com as distintas fases (móvel e estacionária). As técnicas cromatográficas utilizadas para a separação de enantiômeros são a cromatografia líquida, a cromatografia de fluido supercrítico e a cromatografia gasosa;
- eletroforese: técnica que começou a ser utilizada recentemente para separação enantiomérica principalmente com finalidade analítica. A separação enantiomérica por eletroforese está baseada na formação de diastereoisômeros. Estes podem ser formados previamente como resultado de uma reação química entre os enantiômeros que estão sendo avaliados ou separados e um reativo quiral derivatizador. Neste caso, é formado um complexo diastereoisomérico reversível entre os enantiômeros e o reativo quiral, que estará incorporado ao meio reacional;
- extração líquido-líquido: nesta técnica, um seletor quiral é adicionado em uma das fases líquidas na separação dos enantiômeros, os quais serão separados pela diferença de afinidade apresentada em relação à fase líquida.

Na Figura 5 são apresentadas as técnicas utilizadas para separação de enantiômeros.

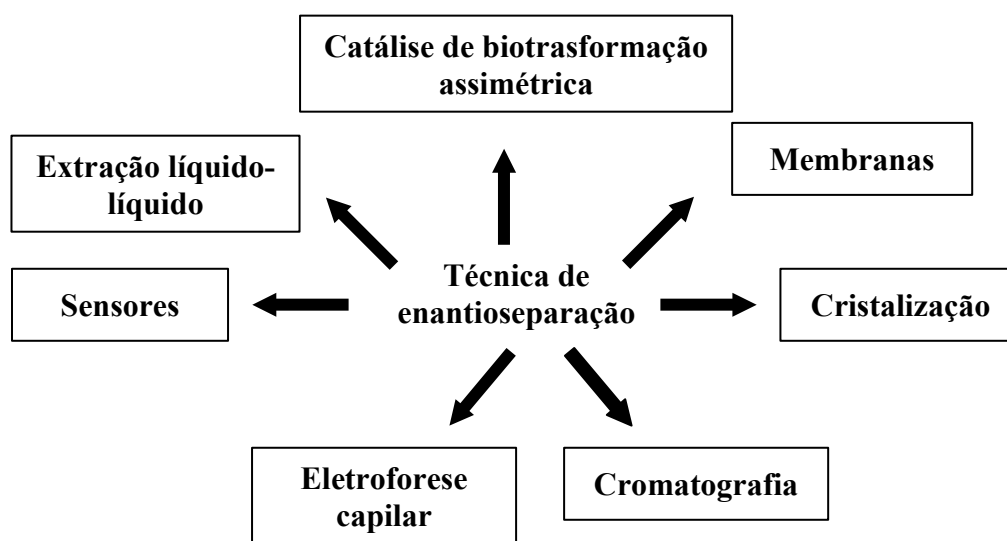


Figura 5: Técnicas utilizada para separação de enantiômeros^[28]

2.3.1.1 Separação de enantiômeros utilizando membranas

As membranas que são utilizadas para a separação de enantiômeros são geralmente membranas sintéticas líquidas ou membranas poliméricas.^[3,33,34]

A separação de misturas racêmicas pode ser realizada por dois processos distintos: a separação indireta, na qual uma membrana não enantiosseletiva faz parte do processo enantiosseletivo ou por separação direta utilizando membranas quirais enantiosseletivas.^[35,36,37]

No processo de separação indireta, a solução de transporte contém a mistura racêmica que se deseja separar juntamente com agentes quirais (que proporcionarão a separação dos enantiômeros). Alguns exemplos de separação indireta são a separação de fármacos empregando derivados do ácido tartárico como agentes quirais,^[38] e a separação do ibuprofeno e do triptofano utilizando a serina albumina bovina (BSA) como seletor quiral.^[39]

A separação direta é baseada na aplicação de membranas quirais, que permitem a passagem de um enantiômero de uma mistura racêmica.^[40]

2.3.1.2 Membranas polimérica enantiosseletivas

As membranas poliméricas enantiosseletivas que são utilizadas para a separação de enantiômeros são formadas por um suporte poroso não seletivo onde é depositada uma camada fina de um agente enantiosseletivo. Os agentes enantiosseletivos mais utilizados são os polissacarídeos, os polímeros acrílicos, os poliactóis e os poliaminoácidos.^[40-43]

Uma alternativa ao uso de polímeros enantiosseletivos é a imobilização de um composto quiral, como aminoácidos, DNA, BSA, anticorpos ou enzimas em uma membrana porosa.^[44-46]

Também estão sendo investigados polímeros de impressão molecular como alternativa para a separação enantiomérica. A preparação destes polímeros está baseada na formação de um complexo entre o monômero do polímero e o enantiômero que se deseja separar. Durante a polimerização, a matriz polimérica que é formada é capaz de memorizar a geometria do complexo formado. Posteriormente, os enantiômeros são eliminados da mistura polimérica, mas os poros do polímero conservam a forma e a estrutura para reconhecer os grupos funcionais dos enantiômeros de interesse.^[47-49]

A seletividade dessas membranas é determinada por interações enantioespecíficas entre os isômeros que irão ser separados e a camada superficial da matriz polimérica, que irá conter o seletor quiral, proporcionando a separação dos compostos na membrana.

A separação geralmente é realizada por solução/difusão, mecanismo similar aos processos de osmose reversa e pervaporação.

A performance das membranas enantiosseletivas depende de dois fatores: a permeabilidade P (fluxo) e a enantiosseletividade (α).

A enantiosseletividade pode ser definida como a razão de permeação entre os dois enantiômeros (L e D); conforme apresentado na equação 1.

$$\alpha = \frac{P_L}{P_D} \quad (1)$$

Uma das vantagens do uso dos processos de separação por membranas para a produção de compostos óticamente puros é sua fácil aplicação em processos de larga escala.^[28]

2.4 Enzimas

As proteínas (enzimas, hormônios, anticorpos) são formadas a partir de um conjunto de α -aminoácidos cuja seqüência e o arranjo tridimensional determinam a função bioquímica destas biomoléculas. A ação enzimática de uma proteína está sempre associada a um sítio ativo ou a um ponto âncora para “prender ou segurar” substratos através das forças intermoleculares, conferindo a esta proteína uma especificidade catalítica.^[50]

Enzimas são proteínas biocatalíticas que regulam a velocidade das reações bioquímicas que ocorrem nos sistemas vivos. Atuam de forma a acelerar a reação com redução da energia de ativação, sem, no entanto alterar a constante de equilíbrio ou a energia livre de reação.^[50]

A aplicação de enzimas em síntese permite reações com alta quimio, regio, diastereo e enantiosseletividade, tornando as biotransformações recomendadas na obtenção de compostos enantiomericamente puros.

2.4.1 Lipases

As lipases (triglicerol acil-hidrolases, EC 3.1.1.3) são classificadas como hidrolases e atuam sobre ligações éster presentes em acilgliceróis, liberando ácidos graxos e glicerol, constituindo uma classe especial de esterases.^[51]

As lipases são encontradas em tecidos de vários animais e plantas, e podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como fungos e bactérias. Do ponto de vista econômico e industrial, os microrganismos são preferíveis do que as lipases de fontes animais e plantas, devido ao alto custo de seu isolamento.^[51]

A massa molar das lipases varia de 20-75 kDa, seu ponto isoelétrico varia em uma faixa de 3,6 a 7,6, sendo majoritariamente ácidas, com pH entre 4 e 5.

O sítio catalítico é formado por Serina-Histidina-Ácido aspártico/ Ácido glutâmico (Ser-His-Asp/ Glu), que se repete em todas as estruturas e é frequentemente protegido da molécula por uma “tampa” hidrofóbica ou “lid” que ao interagir com a interface lipídio/água sofre uma mudança conformacional, expondo o sítio ativo.^[50]

Na Figura 6 são apresentadas as estruturas dos aminoácidos que estão presentes no sítio catalítico da lipase.

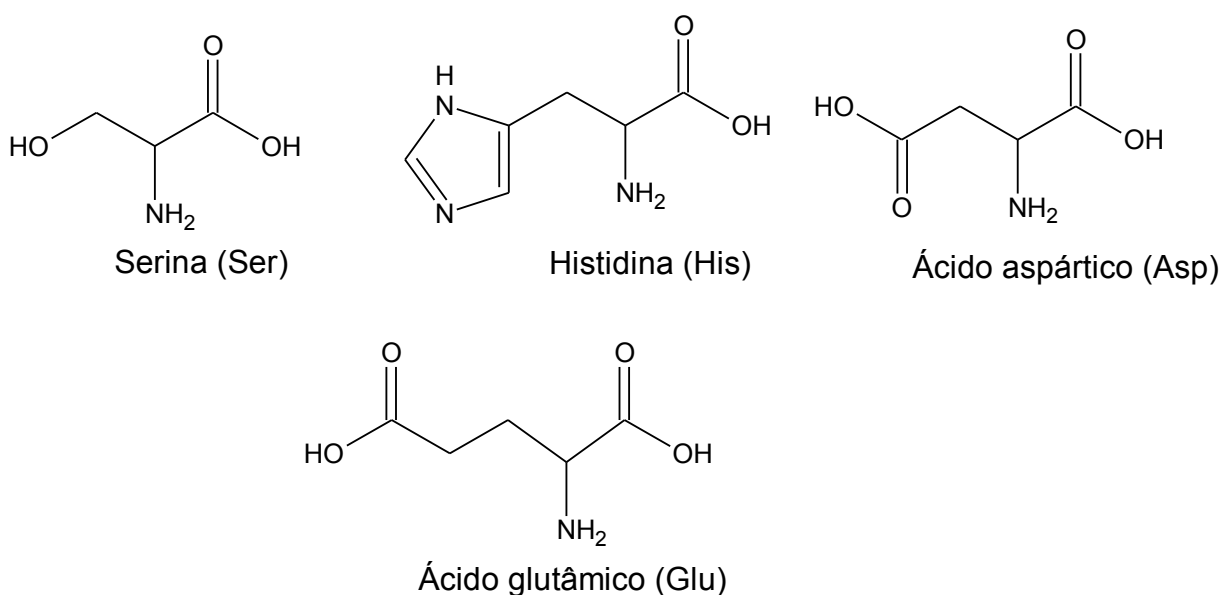


Figura 6: Estruturas dos aminoácidos presentes no sítio catalítico da lipase

As lipases são muito utilizadas em síntese orgânica devido à sua grande disponibilidade e baixo custo. Além disso não requerem cofatores, apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade. Possuem habilidade de catalisar reações de esterificação e transesterificação e têm sido extensivamente investigadas com relação às suas propriedades bioquímicas e fisiológicas e, mais recentemente, para aplicações industriais.^[51]

2.6.2 Imobilização de enzimas

O desenvolvimento de técnicas de imobilização tem sido importante por proporcionar a reutilização das enzimas, facilitar a separação dos produtos e aumentar a estabilidade em solventes orgânicos.^[51]

O principal interesse em imobilizar uma enzima é obter um biocatalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo, em comparação à sua forma livre. Idealmente, a enzima imobilizada deverá exibir uma atividade superior. Além disso, não deverão ocorrer alterações estruturais, bem como modificação no sítio ativo.^[51-53]

Do ponto de vista comercial, as principais vantagens da utilização de enzimas imobilizadas, em relação às enzimas solúveis são: aproveitar a atividade catalítica por um maior período de tempo; operar de forma contínua possibilitando um maior controle das variáveis de processo; facilitar a separação do catalisador e do produto da reação; reduzir o volume de reação; alterar, em alguns casos, as propriedades catalíticas da enzima em relação à sua forma solúvel e facilitar a interrupção da reação, quando se atinge um determinado grau de conversão.^[50]

Alguns pontos devem ser evitados e prevenidos durante o processo de imobilização, como: perda da atividade durante o processo de imobilização; efeitos difusionais, como limitações de acesso do substrato ao sítio ativo devido à presença da matriz sólida; o processo de imobilização deve permitir o livre acesso do substrato ao mesmo tempo que retém a molécula de enzima; o custo da imobilização deve ser compensado pela longa vida do biocatalisador.^[47]

No Quadro 4 são comparadas características dos diferentes processos de imobilização de enzimas.

Quadro 4 : Comparação entre os diferentes métodos de imobilização de enzimas^[47]

Característica	Ligação Cruzada	Adsorção física	Ligação iônica	Quelação/ ligação metálica	Ligação covalente	Encapsulamento
Dificuldade de preparação	Intermediária	Simples	Simples	Simples	Difícil	Difícil
Força de ligação	Forte	Fraca	Intermediária	Intermediária	Forte	Intermediária
Atividade enzimática	Baixa	Intermediária	Alta	Alta	Alta	Baixa
Regeneração do suporte	Impossível	Possível	Possível	Possível	Rara*	Impossível
Custo de imobilização	Intermediário	Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário

Estabilidade	Alta	Baixa	Intermediária	Intermediária	Alta	Alta
Aplicabilidade geral	Não	Sim	Sim	Sim	Não	Sim

* No caso de suportes inorgânicos é possível a regeneração.

Apesar da superioridade das enzimas imobilizadas sobre as solúveis, o processo de imobilização pode modificar a cinética e as propriedades físico-químicas da enzima, normalmente, reduzindo a sua atividade específica.

As modificações das propriedades enzimáticas devem-se aos seguintes fatores:

- efeitos conformacionais – modificação conformacional da molécula devido à alteração na estrutura terciária do sítio ativo;
- efeitos estereoquímicos – uma parte da molécula enzima é imobilizada numa posição tal que o sítio ativo é relativamente inacessível ao substrato;
- efeitos microambientais (efeitos de partição) – interações eletrostáticas entre o suporte e o substrato; neste caso as condições do microambiente próximo à enzima são diferentes daquelas da solução reacional;
- efeitos difusionais ou de transferência de massa – tem origem na resistência de difusão do substrato até o sítio catalítico da enzima, e do produto para a solução.

A imobilização pode ocorrer através da adsorção ou ligação da enzima em um material insolúvel, pelo uso de um reagente multifuncional através de ligações cruzadas, confinamento em matrizes formadas por géis poliméricos ou encapsulamento através de uma membrana polimérica.^[54-60]

A enzima pode ser fixada na superfície de um suporte por meio de interações como a adsorção física, ligação iônica, as ligações covalentes e a ligação a um metal (quelção).^[51]

Na Figura 7 está representado um esquema com a classificação dos métodos de imobilização de enzimas.

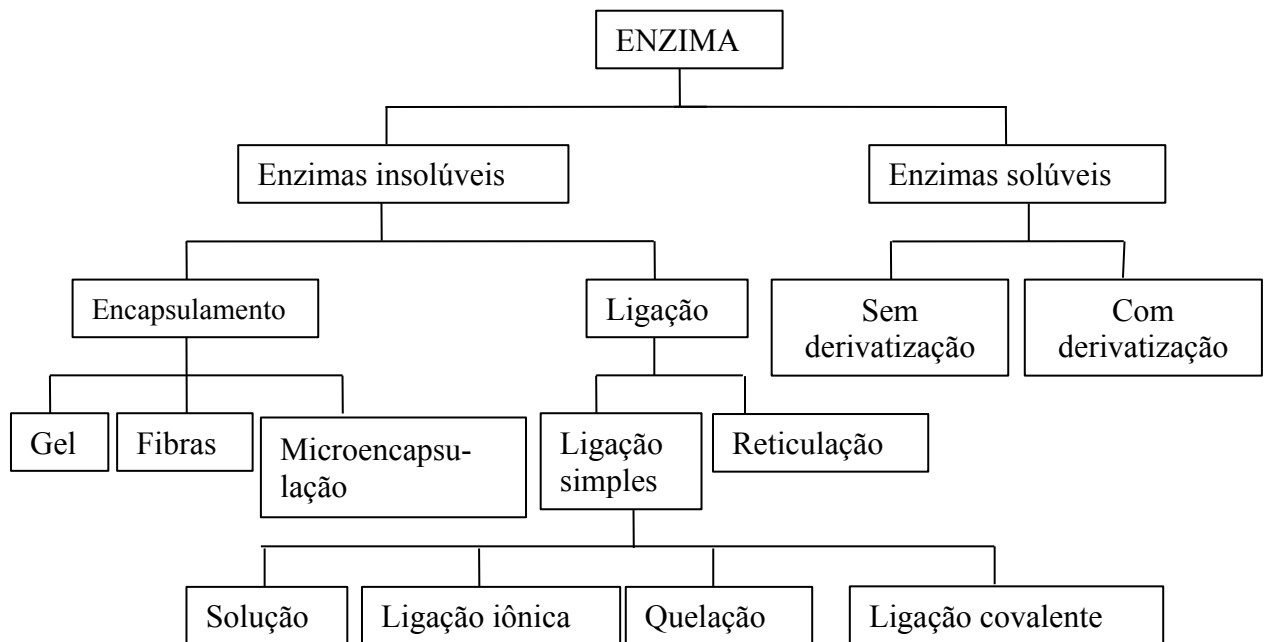


Figura 7 : Classificação dos métodos de imobilização de enzimas^[51]

2.5.1 Imobilização por ligação covalente

Embora os métodos de imobilização por adsorção, ligação iônica e ligação metálica sejam de fácil aplicação, eles não são muito utilizados em processos de larga escala porque a enzima imobilizada tem baixa estabilidade, que resulta da fraca força de ligação e possibilita a perda da enzima do suporte.

Na imobilização por ligação covalente, os grupos funcionais da enzima que tomam parte na ligação destas com o suporte são: grupos amino: α -NH₂ da cadeia terminal e o ϵ -amino da lisina; grupos carboxílicos: β e γ do ácido aspártico e glutâmico, respectivamente, e o α -carboxílico; grupo fenólico da tirosina; grupo sulfídrico da sisteína; grupo hidroxílico da serina, treonina e tirosina; grupo imidazol da histidina; ou grupo indol do triptofano.^[39,51]

A ativação do grupo ligante é frequentemente realizada no suporte a fim de reduzir o risco de diminuição da atividade catalítica da enzima. Na maioria dos casos, os grupos funcionais do suporte são modificados para produzir intermediários reativos, sendo que o reagente mais utilizado é o glutaraldeído, devido à simplicidade do método e obtenção de preparações enzimáticas ativas e estáveis.^[61]

A diversidade de reações químicas e de suportes com grupos funcionais capazes de promover ligações covalentes, ou suscetíveis à ativação, torna este método de imobilização aplicável em muitas situações. Dentre os materiais orgânicos empregados para a imobilização de enzimas por essa técnica encontram-se os polissacarídeos (amido, celulose, dextrana, agarose, quitina, quitosana), proteínas (colágeno), carvão mineral, polímeros sintéticos (poliestireno, poliacrilatos e seus derivados).^[62-65]

2.7 Propranolol

O propranolol, quimicamente reconhecido como o 1-isopropilamino-3-(nafitiloxi)-2-propanol, é um antagonista β -adrenérgico não seletivo. Em função do bloqueio dos receptores β -adrenérgicos que estão presentes em vários órgãos, as ações do propranolol são particularmente importantes sobre o sistema cardiovascular.^[66]

Na Figura 8 é apresentada a estrutura molecular dos isômeros do fármaco propranolol.

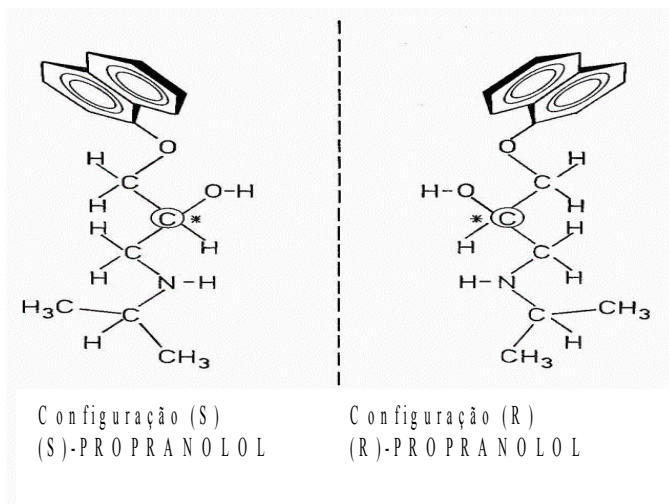


Figura 8: Estrutura molecular dos enantiômeros do fármaco propranolol^[66]

Como pode ser observado na figura 8, a estrutura contém um carbono assimétrico, que forma dois enantiômeros. O enantiômero S-propranolol é indicado para tratamento de hipertensão arterial e o enantiômero R-propranolol não apresenta atividade hipertensiva, mas pode manter outras ações como uma desestabilização da membrana celular, com efeitos colaterais como: insuficiência cardíaca congestiva, depressão mental manifestada por insônia, distúrbios visuais entre outros.^[66]

2.7.1 Separação enantiomérica do propranolol por membranas

A separação enantiomérica do fármaco propranolol por membranas foi realizada pela primeira vez por Heard *et. al.* (1994). Neste caso foi utilizada uma membrana líquida suportada que continha o transportador quirais N-hexadecil-L-hidroxirolina, capaz de formar um par iônico com o enantiômero do propranolol para transportá-lo de maneira facilitada, conseguindo uma certa separação enantiosseletiva do fármaco.^[67]

Seguindo este princípio, foram desenvolvidas membranas líquidas, com dialquiltartaratos como seletores quirais e membranas poliméricas.^[27,68,69]

Em todos os processos de separação do propranolol por membranas foi utilizado como força motriz um gradiente de concentração para a separação. Em todos estes sistemas o mecanismos de transporte é a difusão do propranolol através da membrana, com transporte facilitado de um dos enantiômeros do fármaco. Em diversos casos, o transporte é acompanhado por um contratransporte de prótons. Quando isso ocorre, solventes são incorporados ao sistema para formar um contragradiente de prótons que favorecerá o transporte do fármaco.^[69]

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Polissulfona

O polímero utilizado para a produção das membranas foi a polissulfona (PSU) com peso molecular médio $M_w = 35000$, (Cas number 25135-51-7, MDL number MFCD00134387, fornecida pela Sigma-Aldrich Company). As propriedades desse polímero estão apresentadas na Tabela 1.^[70]

Tabela 1 : Características da PSU comercial (Cas number 25135-51-7, MDL number MFCD00134387 da Sigma-Aldrich Company)

Propriedades	Norma	Valor
Massa específica	ASTM D 792 -98	1,24 g.mL ⁻¹
Índice de Fluidéz 343°C/2,16 kgf	ASTM D 1238 - 00	6,5 g.10min ⁻¹
Viscosidade Específica (concentração 0,2% m/v em clorofórmio)		0,37 – 0,39 dL.g ⁻¹
Resistividade Volumétrica	ASTM D 257	5.10 ¹⁶ Ω.cm
Absorção de água (imersão 24h)	ASTM D 570	0,3 %

A PSU é um polímero caracterizado como termoplástico de engenharia, com alta resistência ao impacto e elevada estabilidade térmica (160°C). Possui estabilidade à esterilização por vapor aquecido, suas propriedades elétricas são mantidas em uma extensa faixa de temperatura (0°C – 160°C), possuindo resistência à degradação por radiação.^[70]

Na Figura 9 é apresentada uma fotografia da PSU na forma de *pellets*.



Figura 9: *Pellets* de polissulfona (Sigma-Aldrich Company)

3.1.2 Membranas Comerciais

Foram realizadas análises de membranas comerciais catiônicas de eletrodialise (ED), Selemion® CMV e CMT produzidas pela Asahi Glass Company – Japão. Essas membranas são produzidas a partir de um copolímero poli[(estireno)-co-(divinilbenzeno)], com resina de troca iônica imobilizada na matriz polimérica.

Algumas características dessas membranas são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Características das membranas comerciais Selemion® CMT e CMV produzidas pela Asahi Glass Company^[71]

Membranas	Espessura (μm)	Contra Íon	Resistência NaCl 0,5 mol.L^{-1} ($\Omega.\text{cm}^2$)	Número de Transporte Na^+
CMT	220	Na^+	5	> 96
CMV	130	Na^+	3	> 96

3.1.3 Enzima

A enzima utilizada para imobilização foi a lipase PS da Amano Enzyme Inc. Esta enzima é produzida a partir de uma cultura submersa, de uma linhagem selecionada de *Burkholderia cepacia*. A enzima é purificada por fracionamento com etanol, resultando em uma enzima com alta atividade lipolítica.

A enzima é produzida na forma de um pó amarelo fraco ou branco, solúvel em água, mas insolúvel em etanol; com alta atividade em uma ampla faixa de pH (3,0 – 11,0), sendo o pH ótimo de 7,0 – 8,0.^[72]

3.1.4 Soluções

3.1.4.1 Tampão

As soluções de tampão fosfato com concentração $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e pH 7,0, foram preparadas, dissolvendo-se 7,7g de Na_2HPO_4 (Merck) e 6,9g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck) em água destilada, completando o volume para 1L de solução.

3.1.4.2 Solução enzimática

Foram preparadas soluções enzimáticas com concentração $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$, dissolvendo-se 10 mg de lipase em tampão fosfato $0,05 \text{ mol.L}^{-1}$ e completando-se o volume para 1L de solução.

3.1.4.3 Reagente de Bradford

O reagente de Bradford foi preparado dissolvendo-se 10 mg do corante Comassie Brilliant Blue G 250 (Merck), em uma solução com 5mL de etanol 95% (Merck) e 10mL de ácido fosfórico (Merck), esta solução foi filtrada a vácuo e o filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 100mL; o volume do balão foi completado com água destilada, obtendo-se o reagente de Bradford.^[73]

Este reagente foi armazenado sob refrigeração e em frasco âmbar, com tempo de vida médio de 30 dias.

3.1.4.4 Solução de acetato de p-nitrofenila e Triton X-100

Foram preparadas soluções de acetato de p-nitrofenila (PNPA) com diferentes concentrações. Para preparação das soluções, o PNPA foi dissolvido em solução de acetonitrila (Merck) à 5% em água destilada.

Foram preparadas soluções de Triton X-100 a 2% em tampão fosfato 0,05 mol.L⁻¹.

3.2 Métodos

3.2.1 Análise de infravermelho FTIR

As análises estruturais foram realizadas por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) com pastilhas de KBr para os *pellets* de PSU. As membranas de PSU após inversão de fase e os *pellets* foram analisados em um espectrofotômetro de infravermelho Nicolet modelo impact 400 de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.2.2 Preparação das soluções de PSU

Os *pellets* de PSU foram solubilizados em clorofórmio (Merck), preparando-se soluções com concentração de 50 g.L^{-1} a 200 g.L^{-1} . As soluções foram mantidas em um agitador magnético por 2 horas a temperatura de 25°C.

A viscosidade das soluções de PSU foi determinada à 25°C em Viscosímetro Brookfield DVII da Brookfield Engineering Laboratories Inc. A tensão superficial foi avaliada, à 25°C, em um analisador de tensão superficial Sensa Dyne modelo QC 3000, com frequência de bolha de 5 segundos.

3.2.3 Determinação do tempo de evaporação do solvente, condições de secagem, condições de tratamento térmico e espessura das membranas de PSU

Soluções de PSU foram preparadas em clorofórmio à 10%. Diferentes volumes desta solução (4 mL, 3 mL e 2 mL) foram vertidos em placas de Petry com diâmetro de 9,5 cm. A temperatura do ambiente foi mantida à $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ e a umidade à $65\pm 2\%$. O tempo de evaporação do solvente foi determinado, avaliando-se a perda de massa (evaporação do solvente) no intervalo de 5 a 30 minutos em balança analítica, com sensibilidade de 1 mg.

As membranas obtidas por inversão de fase em água foram colocadas em estufa a 80°C , variando-se o tempo de permanência desde 0,5 a 24 horas para determinação das condições de secagem.

O tratamento térmico das membranas secas foi realizado a temperatura de $150\pm 5^{\circ}\text{C}$ variando-se o tempo, de 0,5 a 2 horas para determinação das condições de tratamento.

A espessura das membranas foi obtida através de um micrômetro Mututoyo com precisão de 0,001 mm.

3.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Foram realizadas análises de superfície e secção transversal das membranas de PSU obtidas por inversão de fase. Para análise da secção transversal, as membranas foram fraturadas criogenicamente em nitrogênio líquido e metalizadas com ouro. As análises foram realizadas em um microscópio eletrônico de varredura JEOL de alta resolução modelo JSM 5800.

3.2.5 Capacidade de troca iônica

A capacidade de troca iônica das membranas foi determinada por titulação, segundo procedimento descrito por Krol e Strathmann.^[7,11] As membranas foram imersas em solução de HCl 1 mol.L⁻¹ por 24 horas, lavadas com água deionizada para remover o excesso de ácido e colocadas em solução de NaCl 2 mol.L⁻¹ por 5 minutos para troca dos prótons por íons sódio. Para garantir a completa troca iônica, a solução de NaCl foi renovada por 2 vezes, em cada ensaio. As soluções foram reunidas e tituladas com NaOH 0,001 mol.L⁻¹.

3.2.6 Capacidade de adsorção de água

A capacidade de adsorção de água foi determinada de acordo com procedimento descrito por Krol.^[8] A membrana foi mergulhada durante 8 horas em uma solução de NaCl com concentração 0,5 mol.L⁻¹, após a membrana ficou submersa durante 2 dias em água deionizada a 25±5 °C. As membranas foram retiradas da água e secas com um papel absorvente e a massa da membrana molhada foi determinada. A amostra foi seca em estufa Famen a 80 °C até massa constante. A massa das amostras foi medida em balança analítica com sensibilidade de 1 mg, e a capacidade de adsorção de água foi calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ Adsorção de água} = \left(\frac{\text{massa da membrana molhada(g)} - \text{massa da membrana seca(g)}}{\text{massa da membrana seca(g)}} \right) 100 \quad (2)$$

3.2.7 Resistência Aparente do Sistema

A resistência aparente do sistema de ED foi determinada medindo-se a voltagem entre os dois compartimentos que é função da densidade de corrente aplicada, conforme procedimento descrito por Strathmann.^[4,8] Primeiramente a resistência do sistema foi determinada (voltagem / densidade de corrente) sem a presença de membrana na cela. A resistência da membrana foi calculada pela diferença da resistência do sistema sem membrana da resistência do sistema com membrana. O cálculo da resistência foi realizado utilizando a seguinte equação:

$$R_a = \frac{V_a \cdot A}{n \cdot I} \quad (3)$$

onde:

V_a = voltagem entre os dois eletrodos;

A = área de membrana efetivamente empregada;

n = número de pares de membrana;

I = corrente que passa pelo sistema;

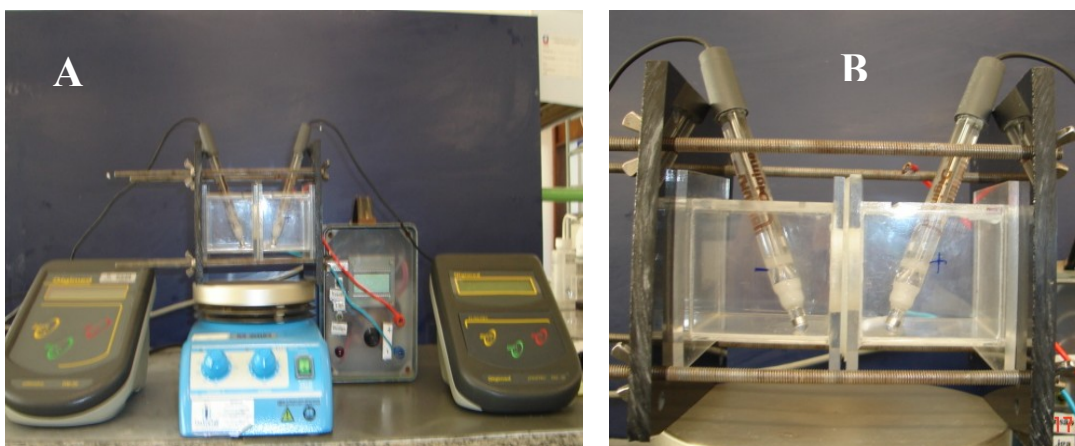
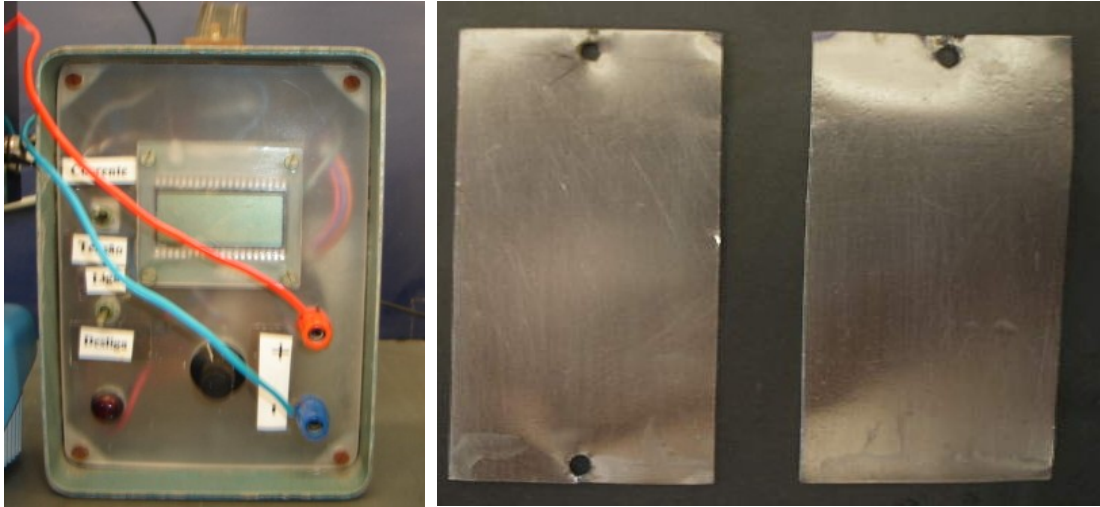


Figura 10: Montagem do sistema de ED para determinação da resistência aparente. A) sistema para determinação da resistência aparente; B) detalhe da cela de ED com eletrodos de prata-cloreto de prata^[4,8]

Figura 11: Fonte e eletrodos de platina do sistema de ED



3.2.8 Seletividade à permeação (permeseletividade)

A seletividade das membranas de PSU foi determinada para um estado de potencial estático, isto é, sem a utilização de corrente no sistema, conforme procedimento descrito por Krol e Strathmann.^[4,8]

O sistema é formado por duas celas separadas pela membrana. Dois eletrodos de prata-cloreto de prata foram colocados nos compartimentos para medir a diferença de potencial através da membrana. Em um dos compartimentos foi adicionada uma solução de KCl 0,1 mol.L⁻¹ e no outro foi adicionada uma solução de KCl 0,5 mol.L⁻¹, a temperatura foi mantida a 25 °C. A permeseletividade da membrana (δ) é: a razão entre a diferença de potencial medido (ΔV_{med}) e a diferença de potencial calculada para uma membrana 100% permeseletiva (ΔV_{calc}).

$$\Delta V_{calc} = \frac{R \cdot T}{z \cdot F} \ln \frac{C_2 \cdot \gamma_2}{C_1 \cdot \gamma_1} \quad (4)$$

Onde:

R = constante dos gases;

T = temperatura;

z = valência eletroquímica;

F = constante de Faraday;

C₁ e C₂ = concentração das soluções;

γ₁ e γ₂ = coeficiente de atividade das soluções;

$$\delta = \frac{\Delta V_{med}}{\Delta V_{calc}} \cdot 100 \quad (5)$$

Antes de realizar o experimento as membranas foram imersas em uma solução de KCl com concentração 0,1 mol.L⁻¹ durante 24 horas. A diferença de potencial foi determinada após o sistema atingir o estado estacionário.



Figura 12: Cella de eletrodialise com dois compartimentos

3.2.9 Calorimetria exploratória diferencial (DSC)

As análises de DSC dos *pellets* e membranas de PSU foram realizadas, em equipamento, Shimadzu, modelo 50. A massa de amostra utilizada foi de 10 ± 1 mg e a taxa de aquecimento utilizada durante a análise foi de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$. A temperatura variou de 0°C a 300°C .

3.2.10 Análise termogravimétrica (TGA)

A perda de massa dos *pellets* e membranas de PSU em função do aumento de temperatura foi determinada usando uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, de 0°C até 800°C . As amostras analisadas continham cerca de 10 mg de massa e a atmosfera utilizada foi nitrogênio. Para a análise de TGA foi utilizada uma balança termoanalítica, Shimadzu, modelo 50.

As temperaturas de perda de massa dos materiais foram determinadas como sendo correspondentes aos valores máximos dos picos obtidos na primeira derivada.

3.2.11 Porosidade

A porosidade das membranas de PSU foi determinada por porosimetria de mercúrio em um porosímetro Autopore IV modelo 9500 da Micrometics Instruments Corp., na Faculdade de Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). O volume máximo de intrusão de mercúrio foi de 100 mL por grama de amostra. A quantidade de poros foi determinada relacionando a área superficial com o diâmetro dos poros.

3.2.12 Imobilização da lipase

O método de imobilização utilizado baseia-se no emprego de glutaraldeído (p.a. Merck) como agente bifuncional formador de ligação covalente entre a enzima e o polímero, conforme descrito por Carta et al. e Knight et al.^[56,74]

As membranas de PSU com espessura de $34\pm 3\mu\text{m}$ foram pesadas em balança analítica, mantidas em solução de HCl 6 mol.L^{-1} durante 10 segundos, lavadas com água destilada, secas e pesadas. As membranas secas foram imersas em solução de glutaraldeído 2,5% durante 1 hora, lavadas novamente com água destilada, secas e pesadas. As membranas foram imersas em solução de lipase com concentração $0,1\text{ mg.mL}^{-1}$, variando-se o tempo de 1 até 24 horas.

3.2.13 Determinação da quantidade de proteína imobilizada

A quantidade de lipase imobilizada foi determinada através do método de Bradford.^[73] A curva de calibração para o método foi montada variando a concentração de lipase de 2,5 até $50\text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$. A reação para ligação do corante Comassie ao anel aromático da lipase foi realizada em uma cubeta de poliestireno (descartável), sob agitação, a temperatura ambiente ($25\pm 5^\circ\text{C}$), durante 5 minutos, com volume total de 2,5 mL. As medidas de absorvância foram

realizadas em um espectrofotômetro de UV/Visível Beckman, modelo DU 530 em comprimento de onda de 595 nm. A medida do branco e da solução foi realizada utilizando-se 2mL de reagente de cor e 0,5mL de água e solução enzimática, respectivamente. Os cálculos da quantidade de enzima imobilizada foram realizados comparando a quantidade de enzima na solução antes e após a imobilização.

Na Tabela 3 são apresentados os dados das quantidades de reagentes utilizadas em cada reação para determinação da quantidade de enzima imobilizada pelo método de Bradford.

Tabela 3: Volumes utilizados na reação para determinação da quantidade de enzima imobilizada

Reagentes	Branco (mL)	Inicial (antes da imobilização) (mL)	Final (após imobilização) (mL)
Comassie Blue	2,0	2,0	2,0
Água	0,5	0	0
Solução enzimática (0,1 mg.mL ⁻¹)	0	0,5	0
Solução enzimática após imobilização	0	0	0,5

Na equação 6 é apresentado o cálculo para a quantidade de proteína imobilizada.

$$\% \text{ de proteína imobilizada} = \frac{\text{proteína inicial} - \text{proteína final}}{\text{proteína inicial}} \cdot 100 \quad (6)$$

3.2.14 Determinação dos parâmetros cinéticos

Foram realizadas cinéticas para a reação da enzima com o substrato acetato de p-nitrofenila (PNPA) e determinação da constante de Michaelis-Menten (K_m) e a velocidade máxima ($V_{máx}$). Para determinação dos parâmetros a quantidade de enzima nas reações foi mantida e as concentrações do substrato variadas.^[75]

Foram preparadas soluções enzimáticas com concentração $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$ e solução de Triton X-100 a 2% em tampão fosfato como tensoativo. A concentração de PNPA na reação variou de 300 a $3000 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

A partir dos dados obtidos para cada concentração de substrato, foi construído um gráfico duplo-recíproco (Lineweaver-Burk), relacionando o inverso das velocidades de reação com o inverso das concentrações de substrato, para determinação de K_m e $V_{\text{máx}}$.

3.2.15 Atividade enzimática para a enzima livre

O método utilizado para a medida da atividade enzimática da enzima livre foi da hidrólise do PNPA.^[63] Foram preparadas soluções de PNPA com concentração de $2,5 \text{ mmol.L}^{-1}$ em acetonitrila/água a 5 %. A concentração da solução enzimática foi de $0,001 \text{ mg.mL}^{-1}$, também foi utilizada solução de Triton X-100 a 2% em tampão fosfato como tensoativo.

Na Tabela 4 são apresentadas as quantidade de reagentes utilizadas para determinação da atividade enzimática da enzima livre por hidrólise do PNPA.

Tabela 4: Volumes utilizados para a reação de hidrólise do PNPA e determinação da atividade enzimática para a enzima livre

Reagentes	Branco (mL)	Amostra (mL)
Triton x-100	0,2	0,2
Tampão fostato de sódio	0,3	0
Solução enzimática	0	0,3
PNPA	1,5	1,5

3.2.16 Análise de dados

Os erros foram calculados utilizando uma distribuição tipo t de Student para 95% de probabilidade. Os ensaios foram realizados em triplicata, exceto a medida da espessura (10 ensaios) e a resistência elétrica e resistência aparente do sistema (5 ensaios).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises do material polimérico, a polissulfona (PSU), utilizado para a preparação dos filmes por inversão de fase foram importantes para a definição das etapas deste estudo. Para adequação da metodologia foram determinados parâmetros como viscosidade, termogravimetria para o processo de inversão de fase e características dos filmes como capacidade de troca iônica, permesselvidade e resistência, para posterior imobilização da enzima visando o uso em eletrodialise (ED).

4.1 Análise térmica da polissulfona

A análise termogravimétrica (TGA) é definida como um processo que envolve a medida de variação contínua de massa de uma amostra em função da temperatura ou do tempo, a uma temperatura constante (modo isotérmico).

Quando uma substância sofre mudanças físicas ou químicas, observa-se uma variação correspondente na entalpia. Se este processo for promovido por uma variação controlada de temperatura, isto constitui a base da técnica conhecida como calorimetria exploratória diferencial ou calorimetria diferencial de varredura (DSC).^[76]

As Figuras 13 e 14 correspondem, respectivamente, aos termogramas de TGA, a primeira derivada (DTG) e DSC para os *pellets* de PSU.

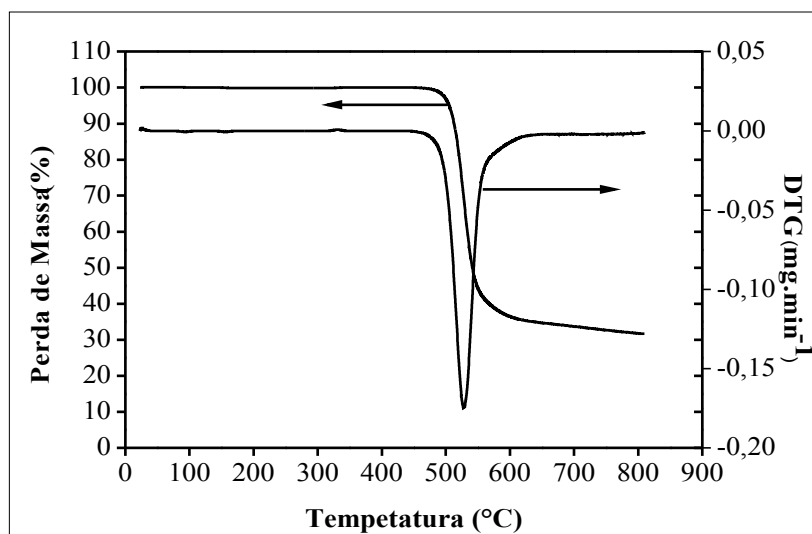


Figura 13: Termograma de TGA dos *pellets* de PSU (taxa de aquecimento 10°C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 800°C)

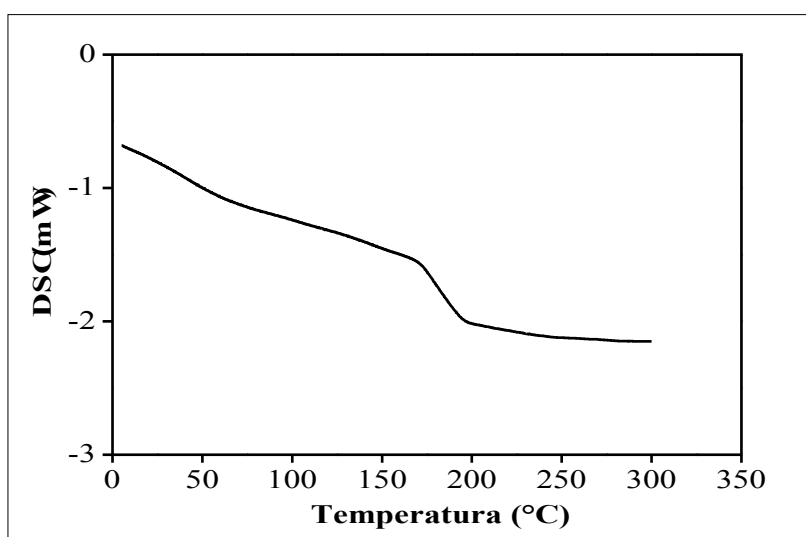


Figura 14: Termograma de DSC dos *pellets* de PSU (taxa de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em N_2 , de 0°C a 300°C)

Os *pellets* de PSU possuem uma temperatura de degradação máxima de 529°C como pode ser observado na Figura 13. Em relação à perda de massa, os *pellets* de PSU apresentaram um resíduo de 31,86% a 800°C .

Nos resultados da análise de DSC pode ser observada uma transição vítrea do polímero a 184°C , esta temperatura corresponde a temperatura na qual o polímero perde sua rigidez pelo relaxamento das cadeias. Esta temperatura está acima da faixa de trabalho (160°C) informada pelo fabricante.^[70]

4.2 Caracterização química da polissulfona

A análise de infravermelho (IV) foi realizada para caracterizar os *pellets* de PSU e para determinar se não ocorreu alteração estrutural nos filmes de PSU após a inversão de fase.

Os resultados da análise estão na Figura 15.

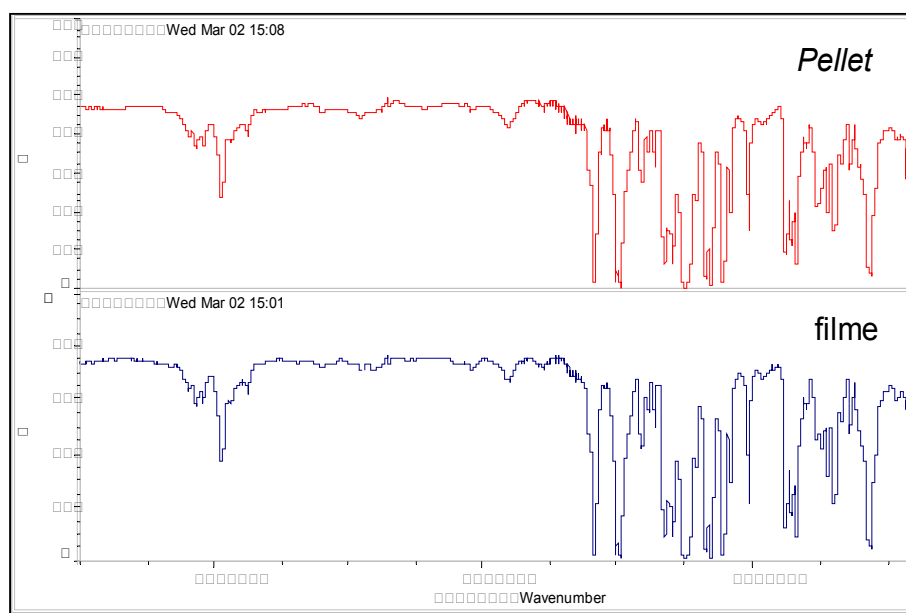


Figura 15: Análise de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) dos pellets de PSU em KBr e dos filmes de PSU, após inversão de fase

Conforme pode ser observado na Figura 15, o espectro apresenta uma banda (duplete) em 3200 cm^{-1} correspondente ao estiramento da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$; a banda que está em 3000 cm^{-1} corresponde ao estiramento da ligação $\text{C}-\text{C}$; a banda que está em 1300 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$ e tem seu correspondente em 1130 cm^{-1} que é um estiramento simétrico da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$; em 1030 cm^{-1} está uma banda que corresponde a ligação $\text{C}-\text{O}-\text{C}$; em 770 cm^{-1} está a banda que corresponde à deformação assimétrica da ligação $\text{C}-\text{S}-\text{C}$ e a banda em 550 cm^{-1} corresponde à deformação simétrica da ligação $\text{O}=\text{S}=\text{O}$. Os espectros de IV dos *pellets* e das membranas de PSU após inversão de

fase apresentam as mesmas bandas, evidenciando a não ocorrência de alterações na estrutura química do polímero após a inversão de fase, assim como a eliminação total da água utilizada no processo de inversão de fase para obtenção da membrana.^[77]

4.3 Viscosidade e Tensão Superficial das soluções de PSU

Soluções com baixa viscosidade (próximo a 1 cP) não podem ser utilizadas para a preparação de membranas por inversão de fase, pois poderá ocorrer capilaridade no espalhamento da solução sobre a placa de vidro, provocando dificuldade no espalhamento da solução.

Soluções com alta viscosidade (maiores que 100 cP) também não podem ser utilizadas, pois a alta concentração de polímero irá dificultar o espalhamento e o a troca de solvente (precipitação) na inversão de fase, conferindo baixa uniformidade aos poros do filme.^[78]

Para a confecção de membranas por inversão de fase as concentrações usuais de polímeros estão na faixa de 100 g.L⁻¹ a 150 g.L⁻¹. Conforme pode-se observar na Figura 16 com concentração de 100 g.L⁻¹, a viscosidade é de 9,9 cP, valor baixo, que irá proporcionar filmes nanoporosos por inversão de fase.^[78]

Na Figura 16 estão representados os resultados das medidas de viscosidade e tensão superficial das solução de PSU, em clorofórmio.

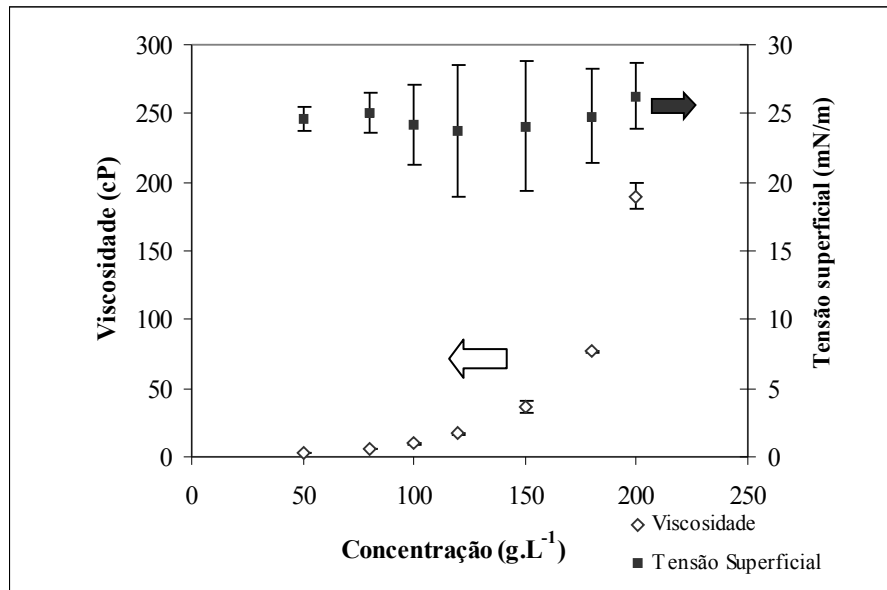


Figura 16 : Relação entre a viscosidade e a tensão superficial das soluções de PSU em clorofórmio com diferentes concentrações do polímero

A viscosidade das soluções de PSU em clorofórmio aumenta, exponencialmente com o aumento da concentração, resultado esperado para determinação da concentração ideal, sendo função da massa molar do polímero (35000 Da).

A tensão superficial também é um parâmetro importante no preparo da solução, pois uma solução com alta tensão superficial, próxima à tensão superficial da água, pode gerar capilaridade, fenômeno que deve ser evitado no processo de inversão de fase. A variação da tensão superficial não foi significativa nas soluções preparadas, indicando que para qualquer concentração a faixa de tensão não irá provocar capilaridade no espalhamento.^[79]

4.4 Tempo de evaporação do solvente

O tempo de evaporação do solvente é um parâmetro importante na obtenção de membranas por inversão de fase. A espessura da membrana irá depender fortemente do tempo de evaporação do solvente. Glavchev *et al.* (2003) estudaram o tempo de evaporação de solvente (acetona e dioxano) para formação de membranas de acetato de celulose com um filme fino, e determinaram uma temperatura do ambiente de $25 \pm 0,1$ °C e umidade de 60-70%.^[79]

Na Figura 17 são apresentados os resultados obtidos na perda de massa, pela evaporação do solvente (clorofórmio), das soluções de PSU com diferentes volumes (2mL, 3mL e 4mL), que foram espalhadas sobre placas de vidro.

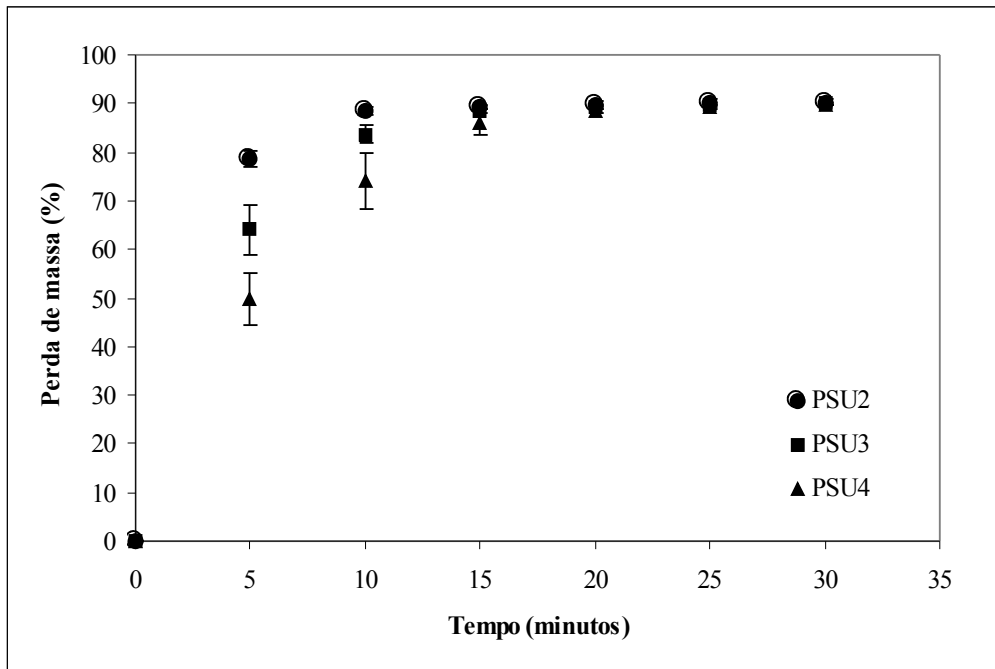


Figura 17: Relação entre o tempo e a perda de massa do solvente (clorofórmio), nas soluções de PSU, antes da inversão de fase (25°C e 65% de umidade)

Foram utilizados 3 volumes de solução (2mL, 3mL e 4mL) para a preparação das membranas PSU2, PSU3 e PSU4, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 17, em 15 minutos ocorre perda de 90% na massa da solução de 2mL que foi vertida sobre a placa de Petry, já para os volumes de 3mL e 4mL este tempo é maior, atingindo 20min e 30min respectivamente. A perda de massa máxima da solução pela evaporação de solvente foi de

90%, correspondendo a quantidade de solvente máxima a ser evaporada para não provocar a formação da membrana antes da imersão no banho de água e para otimizar o processo, isto é, proporcionar a formação da membrana em um curto período de tempo, após a imersão no banho de precipitação, proporcionar maior porosidade e permitir a formação de um filme fino.^[78,79]

Com estes dados foi estipulado um tempo de evaporação de solvente de 15 min para PSU2, 20min para PSU3 e 30min para PSU4. Também foi determinado o tempo de permanência das membranas no banho de água para a inversão de fase. Este tempo foi o mesmo utilizado para a evaporação de solvente para os diferentes volumes (15, 20 e 30 minutos), respectivamente. O tempo de permanência no banho foi definido em virtude da formação do filme (inversão de fase) em 10 ± 2 min após a imersão no banho.

4.5 Condições de secagem

As Figuras 18, 19, 20 e 21 ilustram, respectivamente, os resultados das análises de TGA e DSC, para as membranas de PSU após a inversão de fase, os resultados da perda de massa e a taxa de perda de massa das membranas de PSU na secagem em estufa a 80°C.

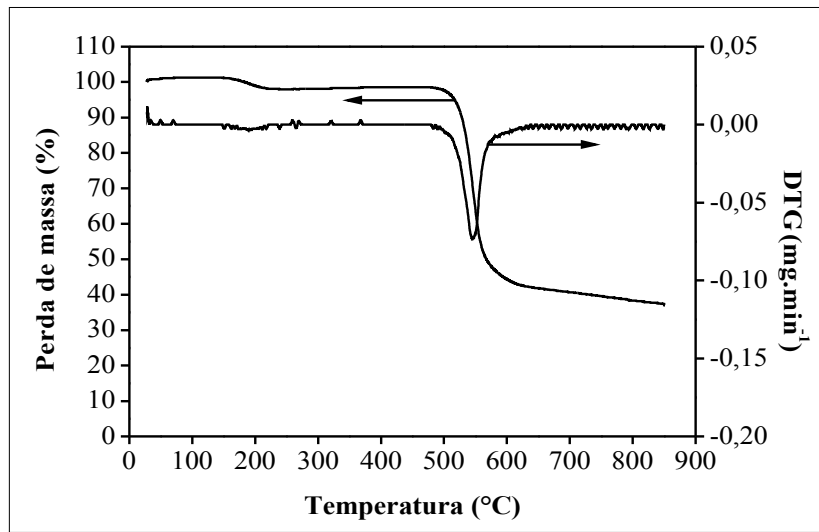


Figura 18: Termograma de TGA das membranas de PSU após inversão de fase em água (taxa de aquecimento $10^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em N_2 , de 0°C a 800°C)

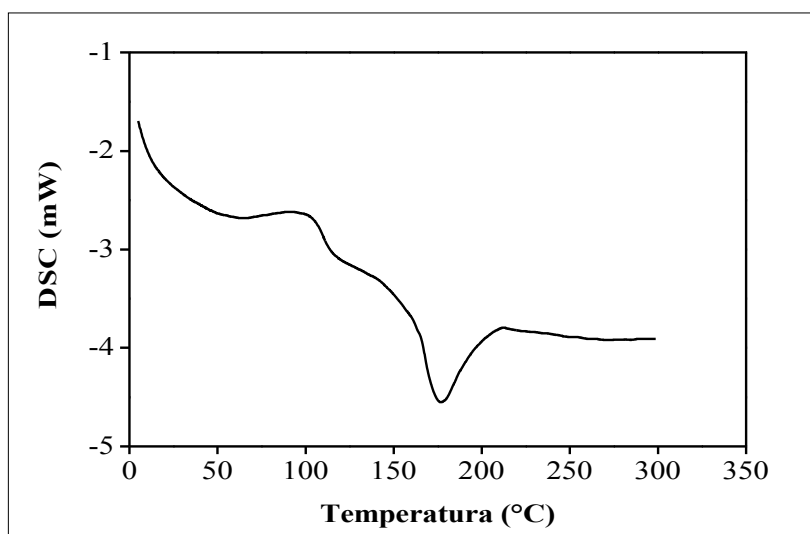


Figura 19: Termograma de DSC das membranas de PSU após inversão de fase em água (taxa de aquecimento $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, em N_2 , de 0°C a 300°C)

As membranas de PSU após a inversão de fase apresentam características térmicas diferentes das apresentadas pelos *pellets*, conforme pode ser observado nas Figuras 18 e 19.

Pela análise de TGA pode ser observada uma perda de massa de 7,28% a uma temperatura de 192°C , essa perda de massa é evidenciada por uma reação endotérmica que ocorre na análise de DSC a uma temperatura de 178°C . Também pode ser observado na Figura 19, que ocorreu um deslocamento na transição vítrea do polímero. Os *pellets* de PSU

apresentavam uma T_g de 184°C (figura 14), enquanto a membrana após a inversão de fase, apresenta T_g de 110°C, o que acarreta uma menor temperatura de trabalho para o polímero.

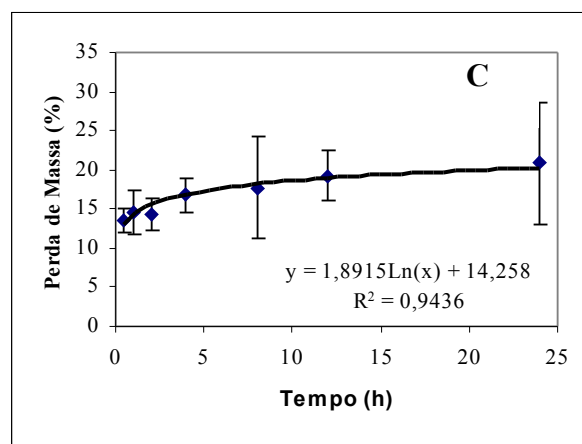
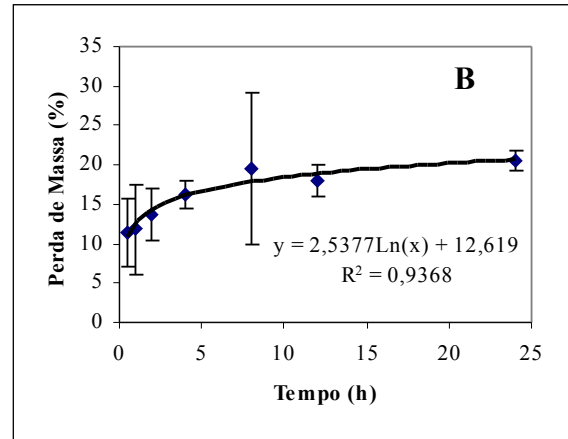
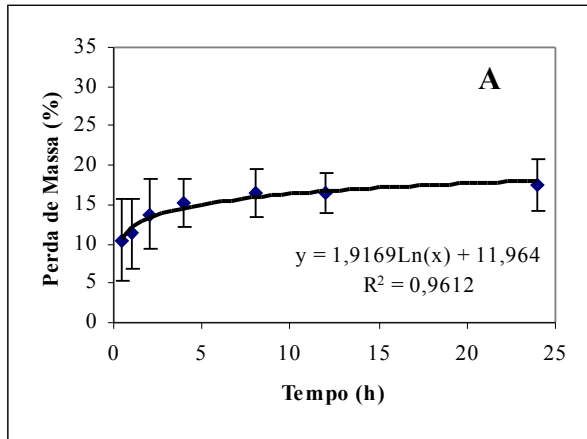


Figura 20: Perda de massa das membranas obtidas por inversão de fase após secagem em estufa a 80°C
A) PSU2, B) PSU3 e C) PSU4

Analisando a Figura 20, pode ser observada perda de massa nas membranas após secagem na estufa a uma temperatura de 80°C. Esta perda de massa se deve à água acumulada na superfície e no interior das membranas, chegando a cerca de 20% da massa que a membrana possuía após a inversão de fase, para um tempo de secagem igual a 24 horas. Este tempo de secagem foi considerado muito longo; então foi realizada a secagem em um tempo menor, mesmo não eliminando totalmente a água da membrana. Esta água poderá ser eliminada no processo de tratamento térmico que deverá ser realizado a uma temperatura superior a 80°C.

Foi determinado um tempo de 8 horas para a secagem das membranas, pois neste tempo, como pode ser observado na Figura 20, as membranas PSU2, PSU3 e PSU4 perderam 16,5%, 19,6% e 17,7% de sua massa, respectivamente, valor muito próximo a perda de massa apresentada pelas membranas após decorridas 24 horas.

A partir da perda de massa média das membranas, foi determinada a primeira derivada e calculada a taxa de perda de massa conforme pode ser observado na Figura 21.

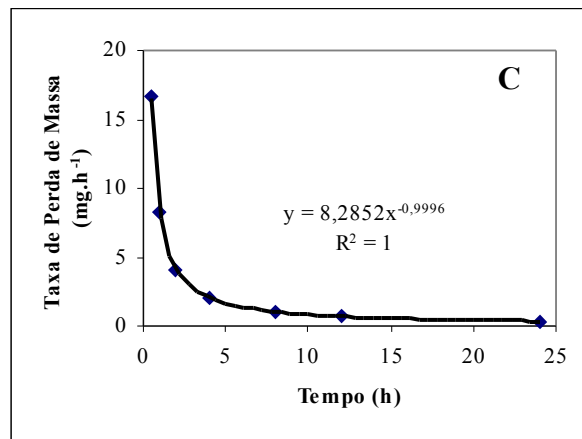
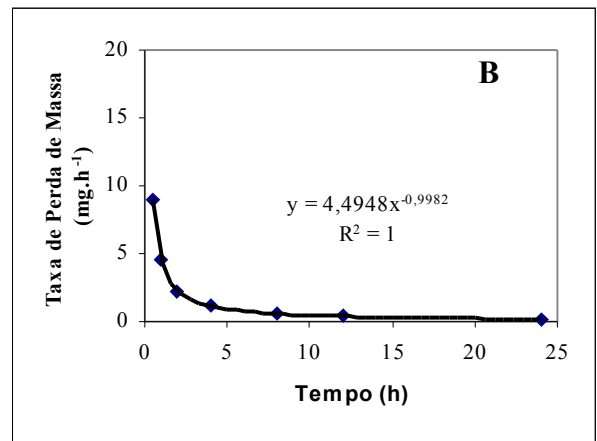
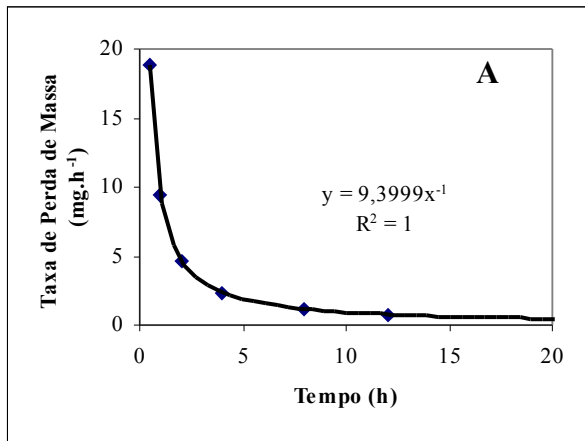
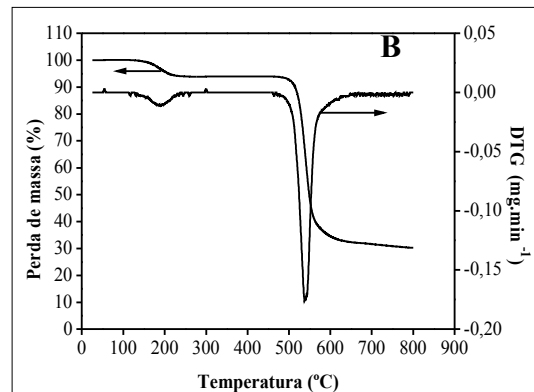
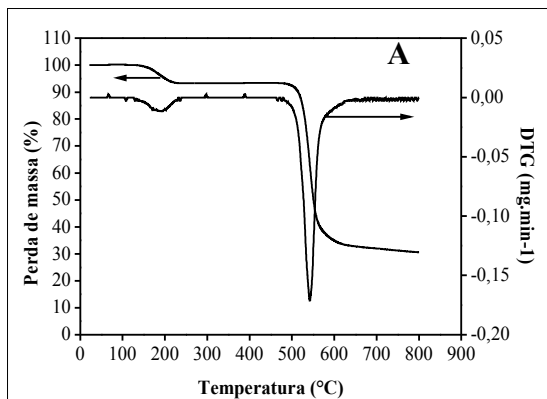


Figura 21: Velocidade de perda de massa das membranas obtidas por inversão de fase após secagem em estufa a 80°C A) PSU2, B) PSU3 e C) PSU4

A taxa de perda de massa das membranas decresce com o passar do tempo e pode ser observado na Figura 21 que não ocorre variação significativa na taxa de perda de massa após 8 horas de secagem, assim determinou-se um tempo de secagem de 8 horas para as membranas; este tempo irá otimizar o processo de secagem, visto que água remanescente, será eliminada na etapa de tratamento térmico, não provocando alterações significantes nas propriedades finais das membranas.

A Figura 22 ilustra os resultados da análise de TGA para as membranas de PSU após secagem em estufa em diferentes tempos (4 horas, 8 horas e 12 horas).



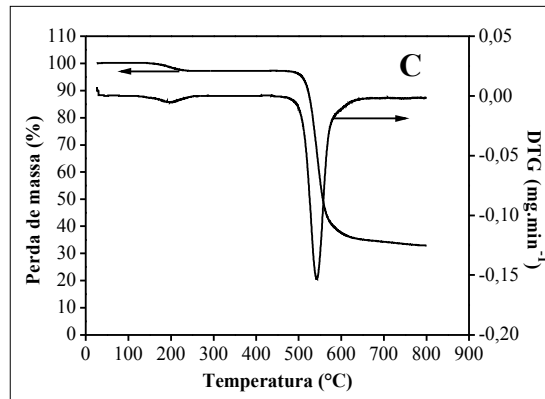


Figura 22: Termogramas de TGA das membranas de polissulfona (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 800°C). A) secagem por 4h, B) secagem por 8h e C) secagem por 12h

Na Tabela 5 são apresentados os resultados das análises de TGA dos *pellets* e das membranas de PSU.

Tabela 5 : Análises de TGA dos *pellets* e membranas de PSU

Amostra	Primeira Perda de Massa		Segunda Perda de Massa		Resíduo	
	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)	Temperatura (°C)	Perda de Massa (%)	Temperatura (°C)	Resíduo (%)
Pellets			529	68,33	800	31,86
Após inversão	192	7,28	536	57,29	800	35,82
de fase						
4h estufa	185	6,87	524	61,34	800	31,24
8h estufa	183	6,12	526	62,19	800	30,29
12 h estufa	189	3,02	521	63,01	800	33,33

Conforme pode ser observado na Figura 21 e na Tabela 5, as membranas de PSU após a inversão de fase e secagem, apresentam perda de massa a 185 °C, para 4 horas de secagem, 183 °C para 8 horas de secagem e 189 °C para 12 horas de secagem, evidenciando que mesmo tempos de secagem longos não eliminam totalmente a água da matriz polimérica.

Estes valores de perda de massa não são característicos da PSU, como pode ser observado na análise dos *pellets* de PSU (Figura 13), sendo atribuída à água intersticial,

proveniente do processo de inversão de fase. Park *et al.* (2005) observaram na inversão de fase, retenção de água em filmes de PSU sulfonadas com ácido clorosulfônico e clorotrimetil silano; essa água era evidenciada na análise de TGA por uma perda de massa que iniciava a 100°C devido a natureza hidrofílica do polímero.^[9]

Tempos de secagem mais longos (acima de 12 horas), poderão eliminar totalmente a água da matriz, mas é indispensável uma etapa posterior de tratamento térmico, à temperaturas mais elevadas, para proporcionar estabilidade dimensional às membranas de PSU.

Nas Figuras 23 e 24 são apresentados respectivamente os termogramas de DSC para as membranas de PSU secas em estufa a 80°C com diferentes tempos de secagem, e os termogramas de DSC para os *pellets* e membranas de PSU secas em estufa a 80°C durante 8 horas.

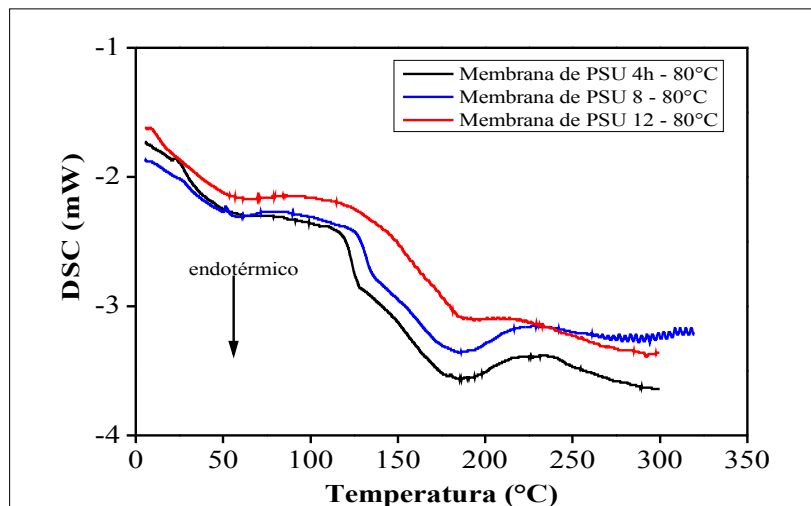


Figura 23: Termograma de DSC para as membranas de PSU secas em estufa a 80°C com diferentes tempos de secagem (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 300°C)

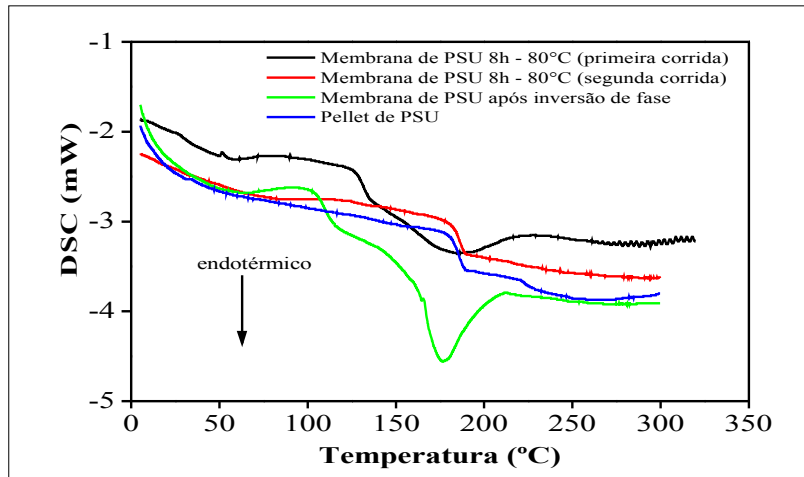


Figura 24: Termograma de DSC dos pellets de PSU, da membrana de PSU após a inversão de fase e das membranas secas em estufa a 80°C durante 8h (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 300°C)

Na Tabela 6 são apresentados os resultados das análises de DSC dos *pellets* e das membranas de PSU.

Tabela 6: Análises de DSC dos *pellets* e membranas de PSU

Amostra	Pico endotérmico (°C)	Transição Vítreas T _g (°C)
<i>Pellet</i>		184
Após inversão de fase	178	110
4h estufa	185	121
8h estufa	186	129
12h estufa		150
Segunda Corrida		184

Um fato importante é a certificação de que o pico endotérmico presente nas membranas (Figuras 23 e 24) é realmente causado pela presença de água na matriz polimérica; para isso foi realizada uma primeira análise de DSC (primeira corrida) em uma membrana seca a 80°C; após esta membrana foi resfriada no ar até a temperatura ambiente e foi realizada uma segunda corrida, com os mesmos parâmetros da corrida anterior (Figura 24).

Na segunda corrida é observado o desaparecimento do pico endotérmico, e a membrana passa a ter características térmicas similares às apresentadas pela PSU na forma de *pellets*. Esse resultado evidencia que a presença do pico endotérmico é ocasionada pela presença de água nos filmes e que esta água pode ser eliminada totalmente pela manutenção das membranas durante um determinado tempo a uma temperatura elevada. Assim para a eliminação desta água foi proposto a realização de uma secagem a 80°C durante 8 horas. Esse tempo de secagem não é suficiente para a completa eliminação da água das membranas, como pode ser observado nas Figuras 23 e 24. Essa água só será eliminada por tempos mais longos de secagem, por secagem a vácuo ou por secagem a uma temperatura superior a 80°C.

4.6 Determinação das condições de tratamento térmico

Nas Figuras 25, 26 e 27 são mostrados os resultados da análise de TGA para as membranas PSU2, PSU3 e PSU4 após tratamento térmico em estufa a 150°C, com tempos de tratamento de 30 minutos, 1 hora e 2 horas, respectivamente.

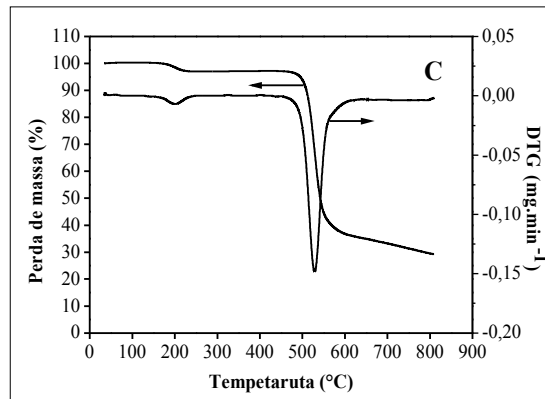
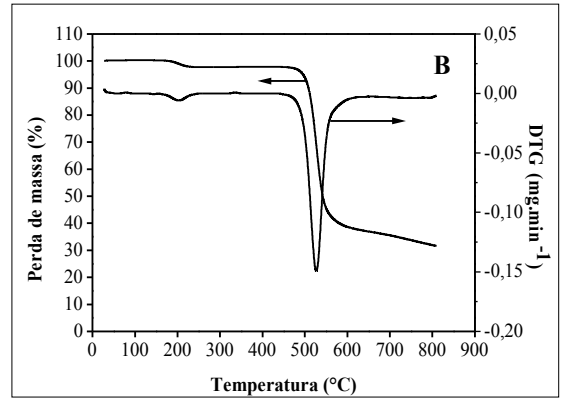
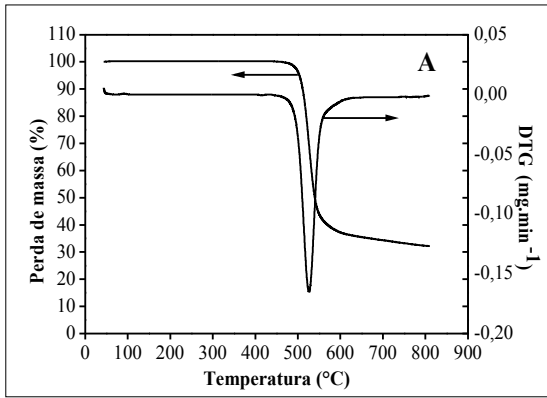


Figura 25: Termogramas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 30 minutos (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 800°C). A) membrana PSU2; B) membrana PSU3 e C) membrana PSU4

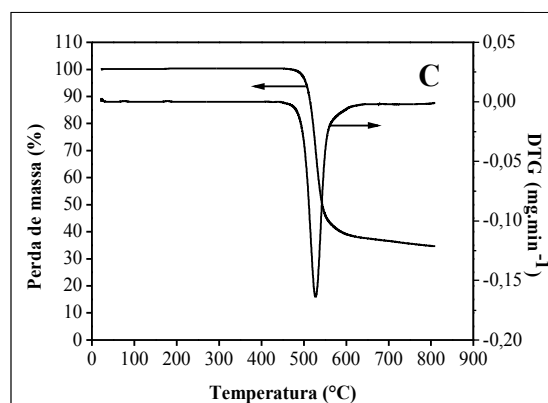
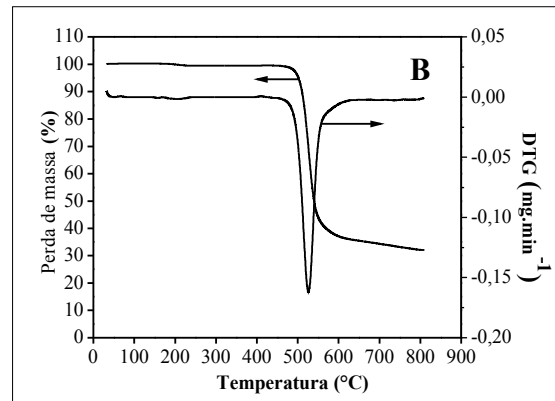
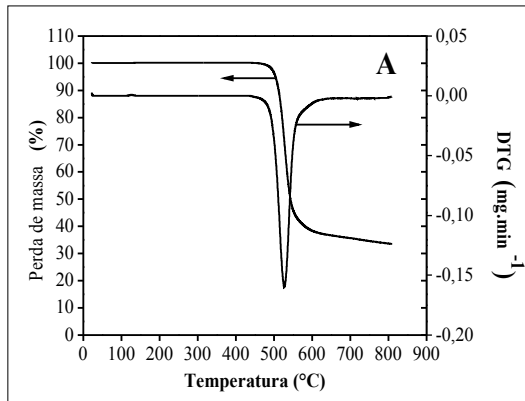


Figura 26: Termogramas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 1 hora (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 800°C). A) membrana PSU2; B) membrana PSU3 e C) membrana PSU4

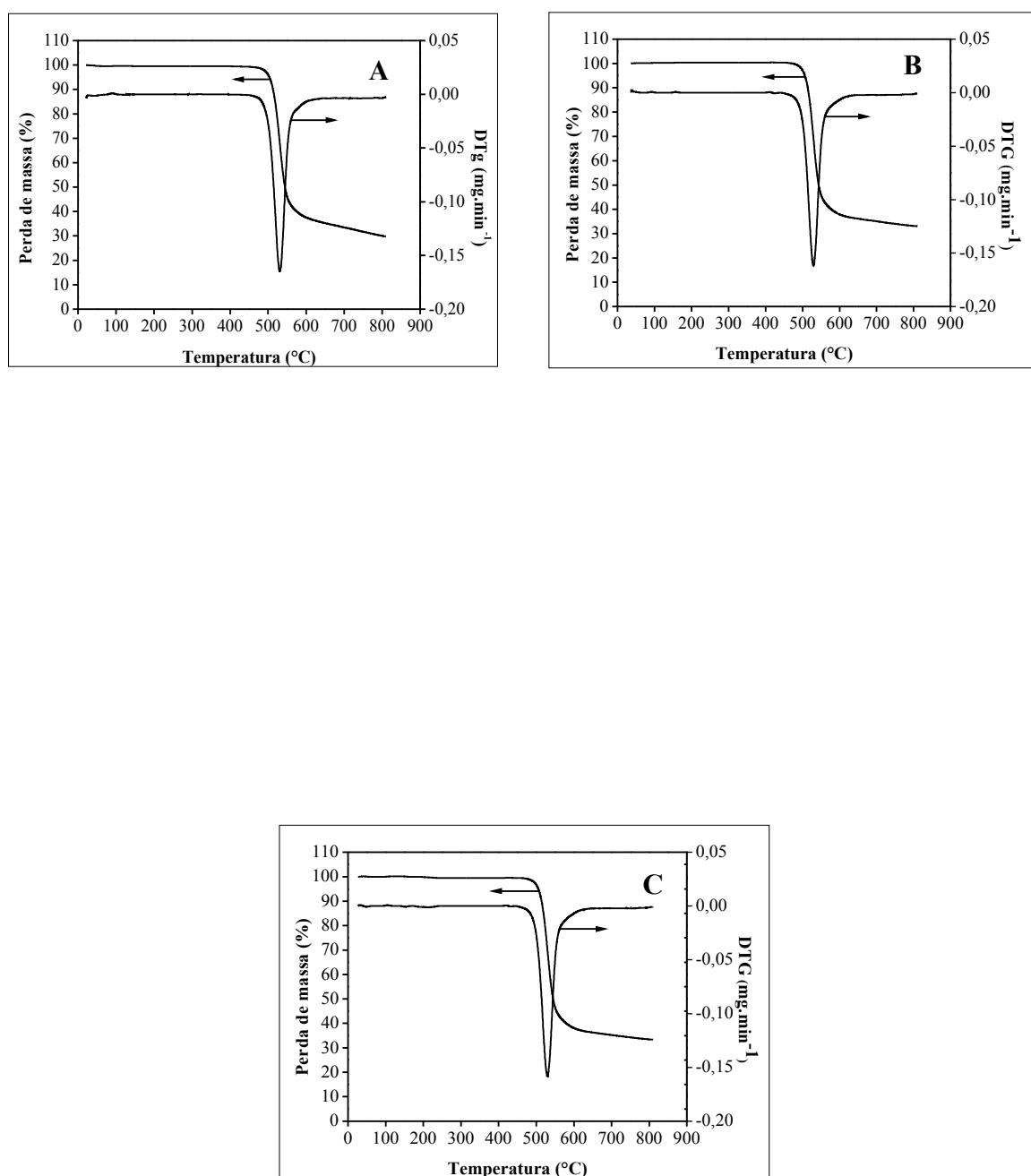


Figura 27: Termogramas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 2 horas (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 800°C). A) membrana PSU2; B) membrana PSU3 e C) membrana PSU4

Na Tabela 7 são apresentados os resultados das análises de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico a 150°C.

Tabela 7 : Análises térmicas de TGA das membranas de PSU após tratamento térmico a 150°C

Amostra	Primeira perda de massa		Segunda perda de massa		Resíduo	
	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Temperatura (°C)	Perda de massa (%)	Temperatura (°C)	Resíduo (%)
PSU2–30min			527	67,7	800	32,35
PSU2 – 1h			529	66,43	800	33,67
PSU2 – 2h			530	70,27	800	29,89
PSU3–30min	203	3,48	527	64,03	800	31,87
PSU3 – 1h	205	0,59	527	67,31	800	32,15
PSU3 – 2h			529	66,79	800	33,2
PSU4–30min	199	4,86	529	64,18	800	31,51
PSU4 – 1h			528	65,22	800	34,78
PSU4 – 2h			530	66,48	800	33,5

Conforme análise de TGA (Figuras 25, 26 e 27), alguns filmes apresentaram perda de massa a temperatura próxima a 180°C, atribuída à água intersticial e à água de reticulação que ficou retida no interior do filme no processo de inversão de fase, sendo eliminada a

temperaturas superiores, em torno de 150°C, proporcionando transparência e estabilidade aos filmes (Figura 28).

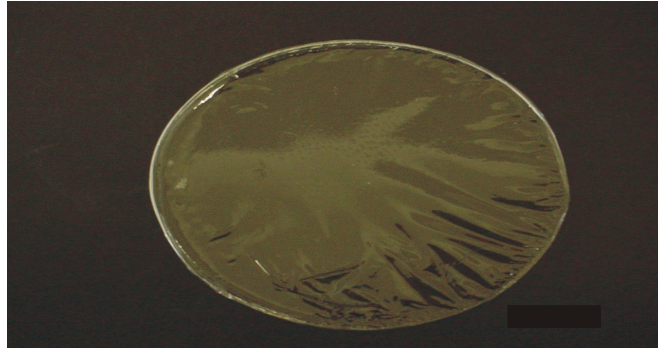


Figura 28: Membrana de PSU obtida por inversão de fase, após o tratamento térmico a 150°C

Como pode ser observado na Figura 29, o pico endotérmico que estava presente na análise de DSC, a temperatura próxima a 180 °C (Figuras 23 e 24), não está mais presente, isto pode ser atribuído ao tratamento térmico a temperatura de 150°C que está eliminando a água retida na matriz polimérica. O tratamento térmico foi efetivo para eliminação da água e o tempo de tratamento deverá ser de 2 horas a 150°C. Tempos menores de tratamento não eliminam totalmente a água presente na matriz em membranas com maior espessura (PSU4).

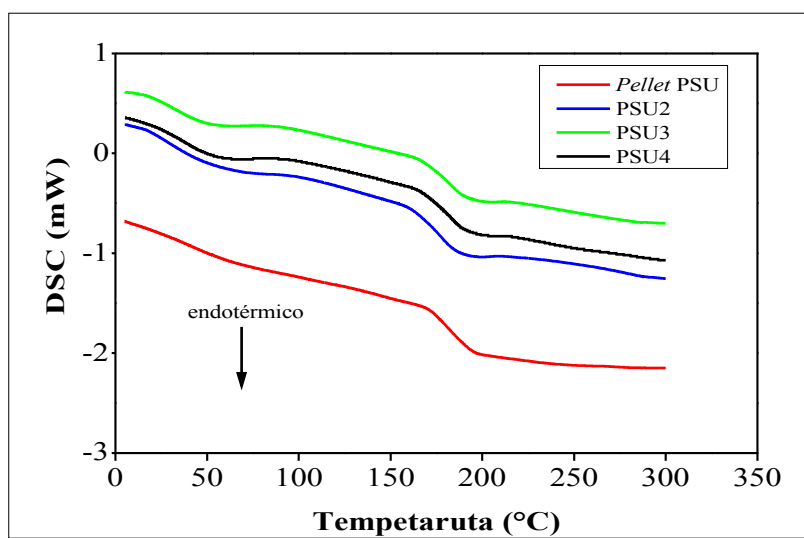


Figura 29 Termograma de DSC dos *pellets* e membranas de PSU após tratamento térmico em estufa a 150°C durante 2 horas (taxa de aquecimento 10 °C.min⁻¹, em N₂, de 0°C a 300°C

Na Tabela 8 são apresentados as temperaturas de transição vítrea, obtidas pela análise de DSC dos *pellets* e das membranas de PSU após tratamento térmico a 150°C.

Tabela 8: Temperatura de transição vítrea obtidas pela análise de DSC dos *pellets* e das membranas de PSU após tratamento térmico a 150°C

Amostra	Transição Vítrea T_g (°C)
<i>Pellet</i>	184
Membrana PSU2	188
Membrana PSU3	183
Membrana PSU4	181

Algumas membranas após o tratamento térmico apresentaram defeitos, como pode ser observado na Figura 30.

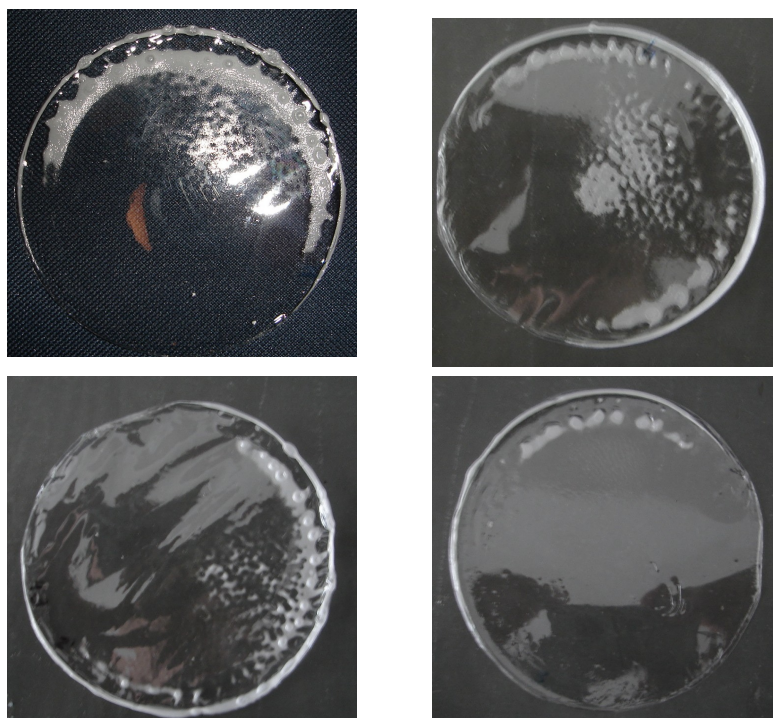


Figura 30: Defeitos apresentados por algumas membranas de PSU após o tratamento térmico a 150°C

Os defeitos presentes nas membranas não eram visíveis antes do tratamento a 150°C. Estes defeitos estavam presentes, principalmente nas membranas com maior espessura. Pode ser observado na Figura 30 que os defeitos localizam-se principalmente na região externa. Essa migração dos defeitos para a parte externa das membranas se deve a parâmetros termodinâmicos, segundo os quais os defeitos irão migrar para uma região de menor energia.^[9,79]

Outro fato a ser considerado, é que o tratamento térmico homogeneiza a porosidade, formando uma estrutura mais compacta evitando a formação de macroporos na região útil da membrana, segundo Park *et al.* (2005) a formação de membranas por inversão de fase sempre é acompanhada de alta assimetria e em alguns casos macroporos, sendo necessário, para algumas membranas a adição de agentes de nucleação como polivinilpirrolidona (PVP).^[9]

4.7 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Microscopia eletrônica de varredura (MEV) é um método muito utilizado para a caracterização da morfologia e tamanho de poros de membranas.^[4]

Nas Figuras 31 e 32 são mostrados os resultados de MEV da superfície e da secção transversal das membranas de PSU.

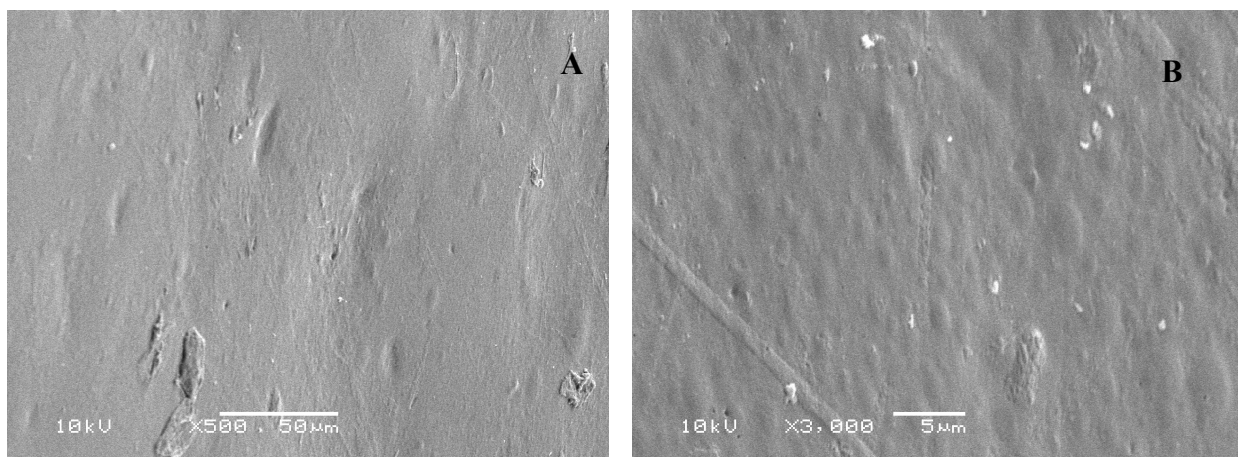


Figura 31: Micrografias obtidas em MEV da superfície dos filmes de PSU com ampliação de A) 500X e B)3000X

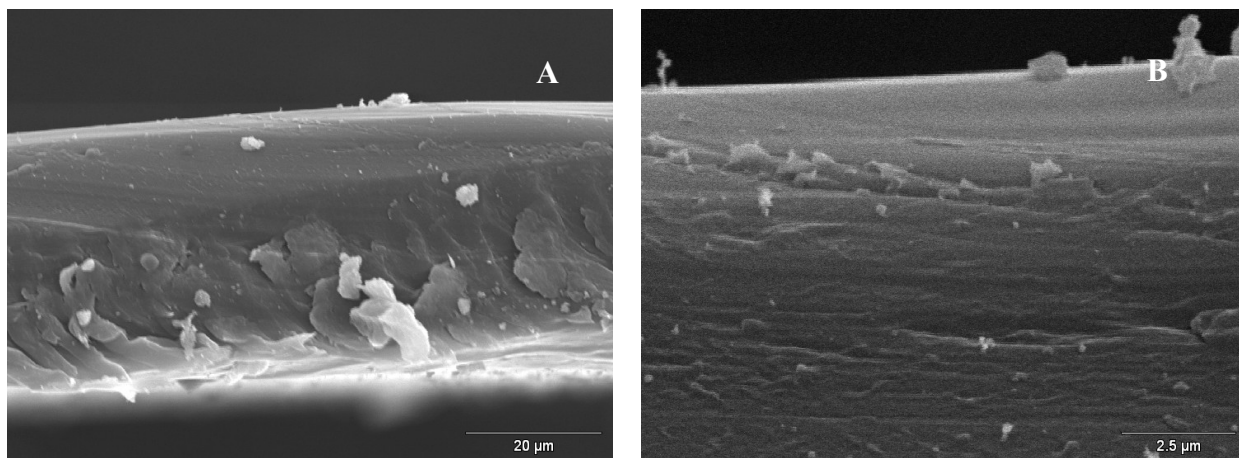


Figura 32: Micrografias obtidas em MEV da secção transversal dos filmes de PSU obtidos por inversão de fase e fraturados criogenicamente com N₂ líquido. Ampliação de: A) 500X e B) 5000X

Os poros das membranas de PSU são menores que 2,5 µm, como pode ser observado nas Figuras 31 e 32. Com a ampliação máxima obtida (5000X) não puderam ser observados poros nas membranas, mesmo quando estas foram fraturadas e foram realizadas análises da secção transversal.

4.7 Espessura das membranas

As membranas obtidas pelo processo de inversão de fase PSU2, PSU3 e PSU4 apresentaram espessura final de $34\pm 3\mu\text{m}$, $48\pm 4\mu\text{m}$ e $54\pm 6\mu\text{m}$, respectivamente; espessura inferior a das membranas Selemion[®] CMV com $123\pm 2\mu\text{m}$ e CMT com $214\pm 1\mu\text{m}$ e valor inferior ao encontrado usualmente para as membranas de ED (50 a 250 µm).^[4] A menor espessura das membranas de PSU deverá facilitar o processo de ED, visto que a difusão através da membrana será facilitada.

4.8 Capacidade de troca iônica

A capacidade de troca iônica das membranas foi determinada por titulação, segundo procedimento descrito por Krol e Strathmann.^[7,11]

Na Figura 33 são mostrados os resultados da capacidade de troca iônica para as membranas de PSU obtidas por inversão de fase, em comparação com membranas comerciais de eletrodialise.

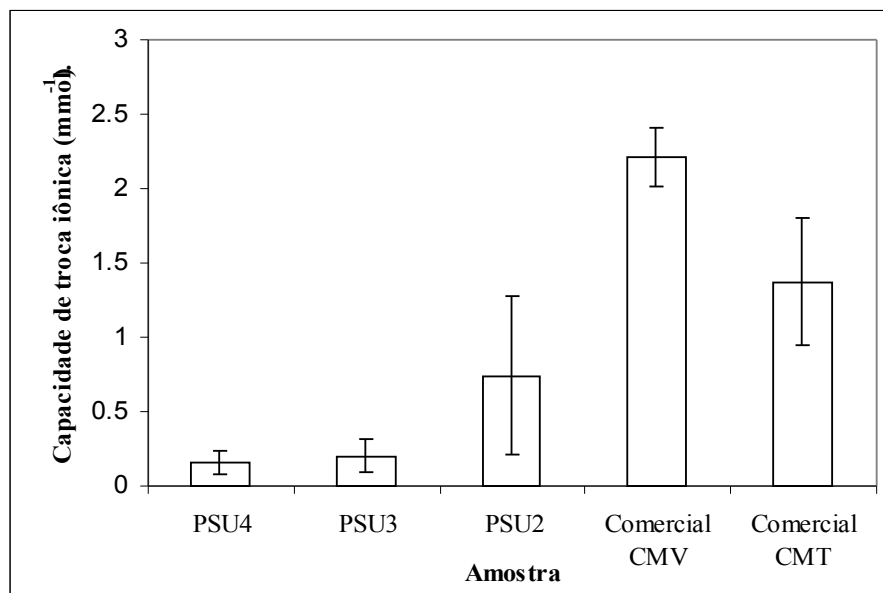


Figura 33: Capacidade de troca iônica das membranas de polissulfona PSU2, PSU3 e PSU4 e membranas comerciais de eletrodialise Selemion® CMV e CMT

As membranas de PSU obtidas por inversão de fase apresentaram capacidade de troca iônica inferior à das membranas comerciais Selemion® CMV e CMT. Este resultado já era esperado, visto que as membranas comerciais apresentam resina de troca iônica imobilizada no substrato polimérico, enquanto nas membranas de PSU essa capacidade é originada pelos grupos sulfônicos livres na superfície do polímero.^[9]

Também pode ser observado, que a membrana com menor espessura (PSU2) é a que apresenta a maior capacidade de troca iônica; e esta propriedade diminui com o aumento na espessura. A capacidade de troca iônica da membrana PSU2 foi de $0,74 \pm 0,53$ mmol.g⁻¹ valor próximo ao encontrado em membranas de polissulfona sulfonadas (0,6 – 1,5 mmol.g⁻¹), que foram desenvolvidas por Park *et. al.* e utilizadas para a condução de prótons e transporte de metanol.^[9]

4.9 Capacidade de adsorção de água

A medida da adsorção de água pelas membranas poliméricas é um método importante no controle e informação sobre a hidrofília /hidrofobia. Segundo Wang *et. al.* (2006) a capacidade de adsorção de água para membranas de álcool polivinílico com β-ciclodextrina como seletor quiral (CSAM) é de 50-55%; essas membranas são utilizadas para separação de misturas racêmicas.^[80]

Na Tabela 9 são apresentados os valores para a capacidade de adsorção de água e capacidade de troca iônica das membranas de PSU e das membranas comerciais Selemion®.

Tabela 9: Valores para a capacidade de adsorção de água e capacidade de troca iônica das membranas de polissulfona PSU2, PSU3 e PSU4 e das membranas comerciais Selemion® CMV e CMT

PSU2	PSU3	PSU4	Membrana	Membrana
------	------	------	----------	----------

				CMV	CMT
Adsorção de água (%)	0	0,19±0,8	2,6±0,43	12,5±3,1	18,6±1,7
Capacidade de troca iônica (mmol.g⁻¹)	0,74±0,53	0,20±0,11	0,16±0,08	2,21±0,20	1,37±0,42

As membranas de PSU obtidas por inversão de fase, apresentam capacidade de adsorção de água muito baixa, como pode ser observado na Tabela 9. Essa baixa adsorção de água se deve à hidrofobia do polímero. As membranas apresentam adsorção de água muito inferior à apresentada por membranas de polissulfona sulfonadas, desenvolvida por Park *et. al.* (2005), que apresentam adsorção de água máxima de 58%.^[9]

As membranas comerciais apresentam adsorção de água de 12,5±3,1% para a membrana CMV e 18,6±1,7% para a membrana CMT. A capacidade de adsorção de água máxima obtida foi de 0,74±0,53% para a membrana PSU2, estes resultados estão de acordo com o observado por Park *et. al.* (2005) que relacionaram a hidrofília à capacidade de troca iônica.^[9]

4.10 Seletividade à permeação (permeseletividade)

A permeseletividade é um parâmetro importante para caracterizar membranas de eletrodialise. Ela determina a capacidade de permeação de uma solução de KCl em um sistema com potencial estático (sem a presença de corrente).

Na Figura 34 são apresentados os resultados da seletividade à permeação (permeseletividade) para as membranas de PSU obtidas por inversão de fase, em comparação com membranas comerciais de eletrodialise Selemion® CMV e CMT.

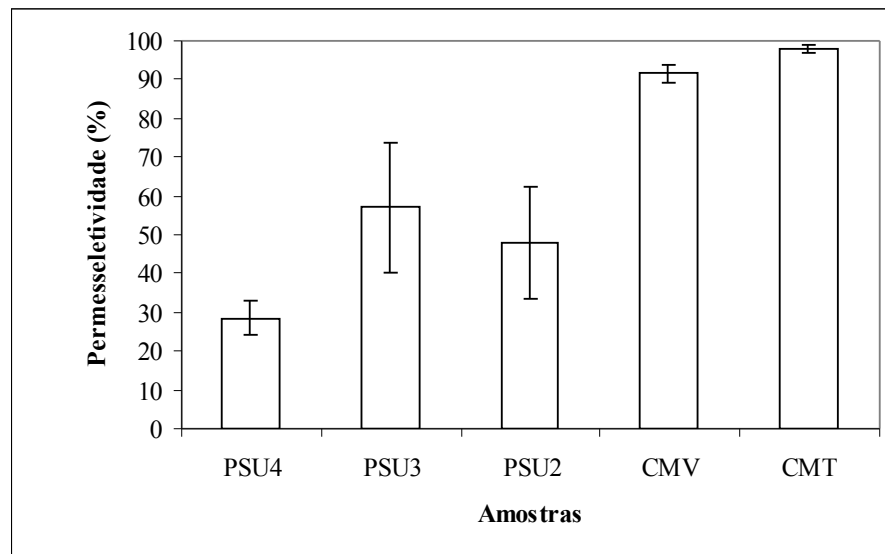


Figura 34: Permeabilidade das membranas de PSU e das membranas comerciais Selemion® CMV e CMT (solução de KCl)

As membranas CMV e CMT apresentaram permeabilidade acima de 90%, valor superior ao apresentado pelas membranas de PSU e valor similar ao encontrado por Krol J.J. (1997), na análise de membranas de ácido sulfônico comerciais Neosepta® CMX da Tokuyama Soda Inc.^[8] A membrana que apresentou a maior permeabilidade ($57,7 \pm 16,7\%$) foi a PSU3. A membrana PSU2 apresentou permeabilidade intermediária e o PSU4 foi a que apresentou a menor permeabilidade (Figura 34).

Mesmo com valor inferior ao das membranas comerciais, estas membranas possuem capacidade para serem utilizados como membranas de eletrodialise no processo de separação

de misturas quirais, pois segundo Wang *et. al.* (2006) a seletividade da membrana está relacionada ao seletor quiral incorporado à matriz polimérica.^[80]

4.11 Resistência aparente do sistema

A resistência aparente é a medida da resistência elétrica total do sistema com as membranas, porém essa medida só é válida para o sistema utilizado neste trabalho, pois a resistência elétrica é diferente entre diferentes sistemas de ED.^[8]

Os ensaios de resistência elétrica, foram realizados com densidade de corrente máxima de $20\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$, pois as membranas de PSU preparadas por inversão de fase, não resistem a densidades de correntes maiores. Valores de densidade de corrente maiores que $20\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ provocam furos nas membranas de PSU devido a alta resistência destas à passagem de corrente.

Segundo Park *et. al.* (2005), em ED a resistência elétrica das membranas íon-seletivas, compete com a força motriz do sistema e é geralmente função da troca iônica dos sítios funcionais da membrana (SO_3^-).^[9]

Nas Figuras 35 e 36 e 37 são mostrados os resultados da resistência elétrica da cela de ED, resistência aparente do sistema e resistência elétrica das membranas de PSU e das membranas comerciais Selemion[®] CMV e CMT.

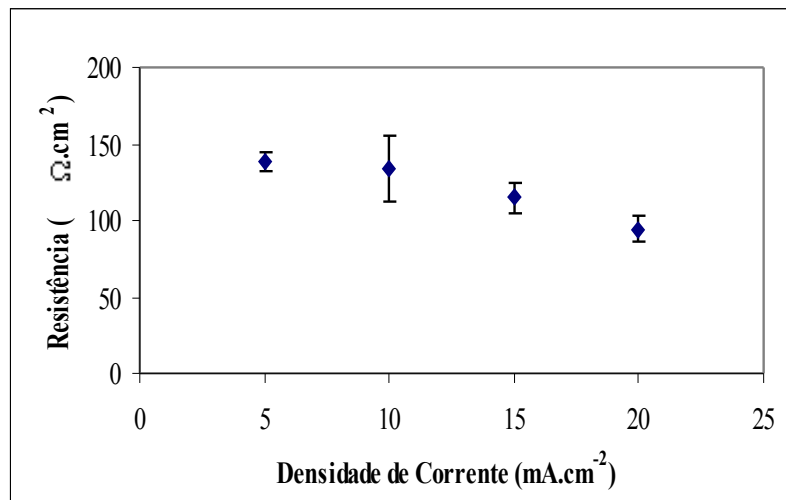


Figura 35: Resistência elétrica do sistema (cela) de ED de dois compartimento, sem membranas

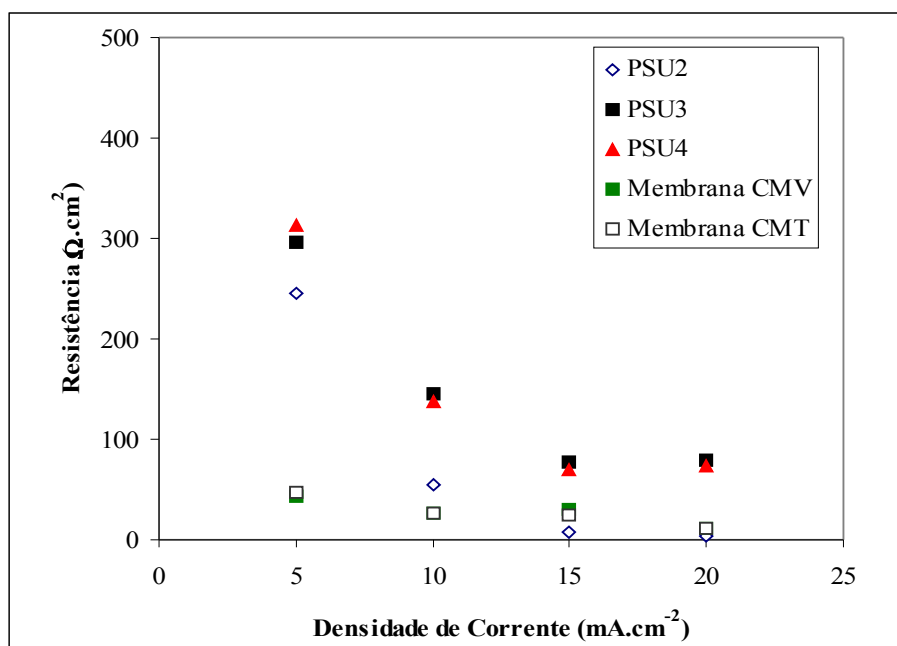


Figura 36: Resistência elétrica das membranas de PSU e das membranas comerciais CMT e CMV

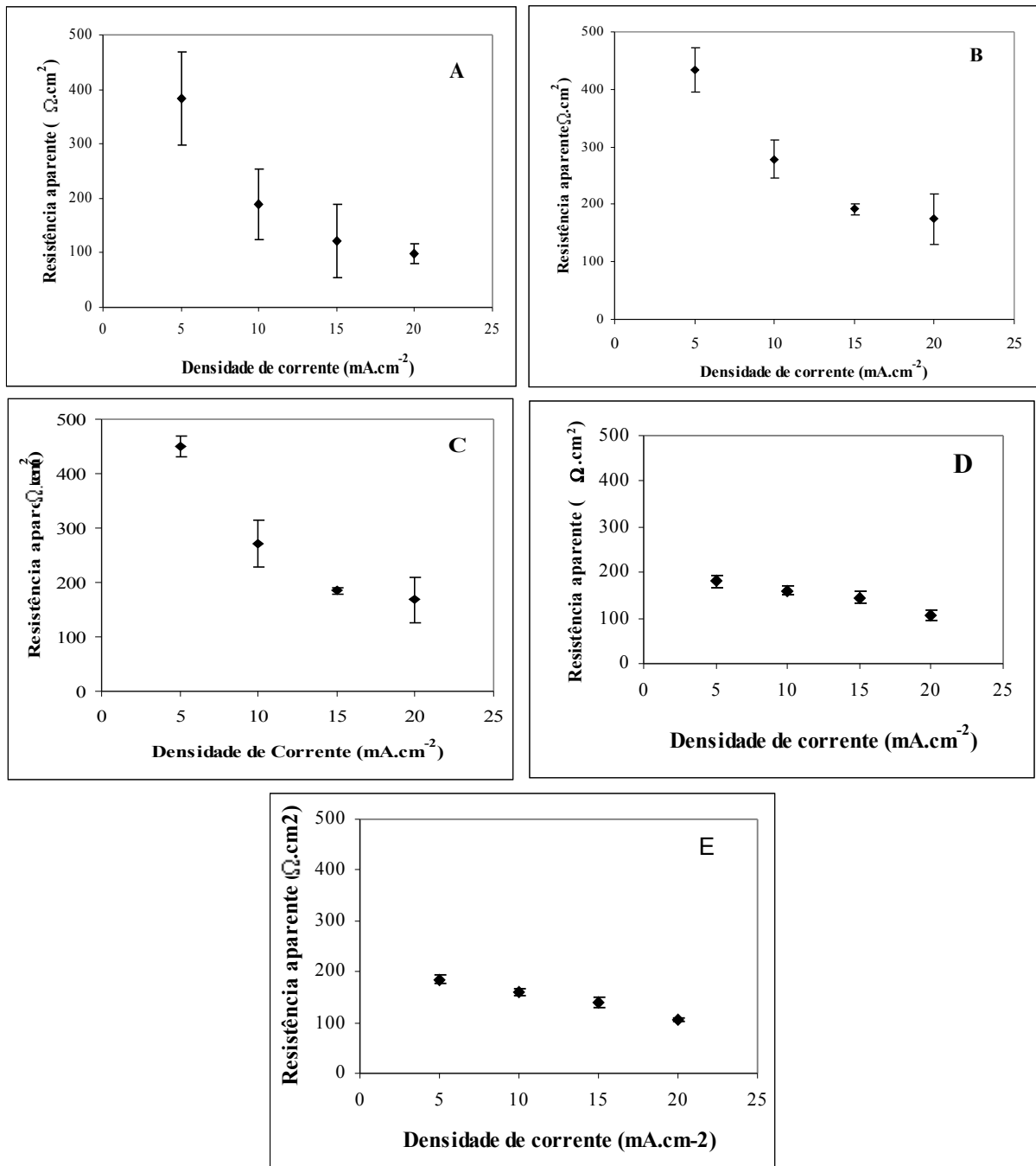


Figura 37: Resistência aparente do sistema de ED: A) com membrana PSU2, B) com membrana PSU3, C) com membrana PSU4, D) com membrana CMV e E) com membrana CMT

Pode ser observado que a resistência elétrica diminui com o aumento da densidade de corrente. A resistência aparente do sistema e a resistência elétrica dos filmes PSU3 ($80,16 \Omega \cdot \text{cm}^2$) e PSU4 ($73,49 \Omega \cdot \text{cm}^2$), foi superior a das membranas comerciais Selemion[®] CMV ($11,99 \Omega \cdot \text{cm}^2$) e CMT ($11,41 \Omega \cdot \text{cm}^2$) (Figuras 36 e 37).

A membranas de PSU com menor espessura (PSU2) foi o que apresentou menor resistência elétrica ($3,49 \Omega \cdot \text{cm}^2$), resistência similar a obtida por Krol J.J. (1997) para membranas comerciais de ácido sulfônico Neosepta[®] CMX da Tokuyama Soda Inc. Essa resistência elétrica também é superior à especificada pelo fabricante que é de $5 \Omega \cdot \text{cm}^2$ para a membrana CMT e $3 \Omega \cdot \text{cm}^2$ para a membrana CMV, esse erro se deve a baixa sensibilidade dos equipamentos utilizados para determinação da resistência aparente do sistema, pela alta resistência das membranas e alta resistência da cela, o que poderá provocar erro nas análises.^[8,73]

4.12 Porosidade

A partir dos dados obtidos na porosimetria de mercúrio, foi calculada a distribuição de poros para cada membrana de PSU.

Nas Figuras 38, 39 e 40 são mostrados os resultados da distribuição média dos poros para as membranas de PSU.

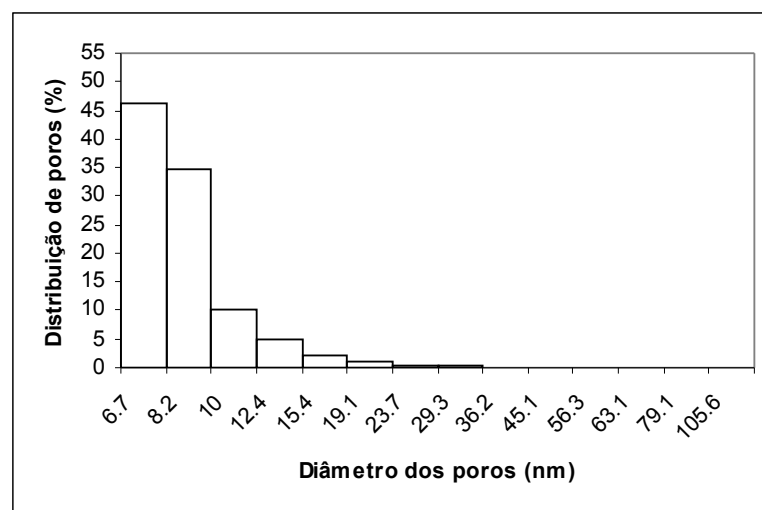


Figura 38: Distribuição média de poros (%) versus diâmetro dos poros das membranas de polissulfona PSU2 (porosimetria de mercúrio)

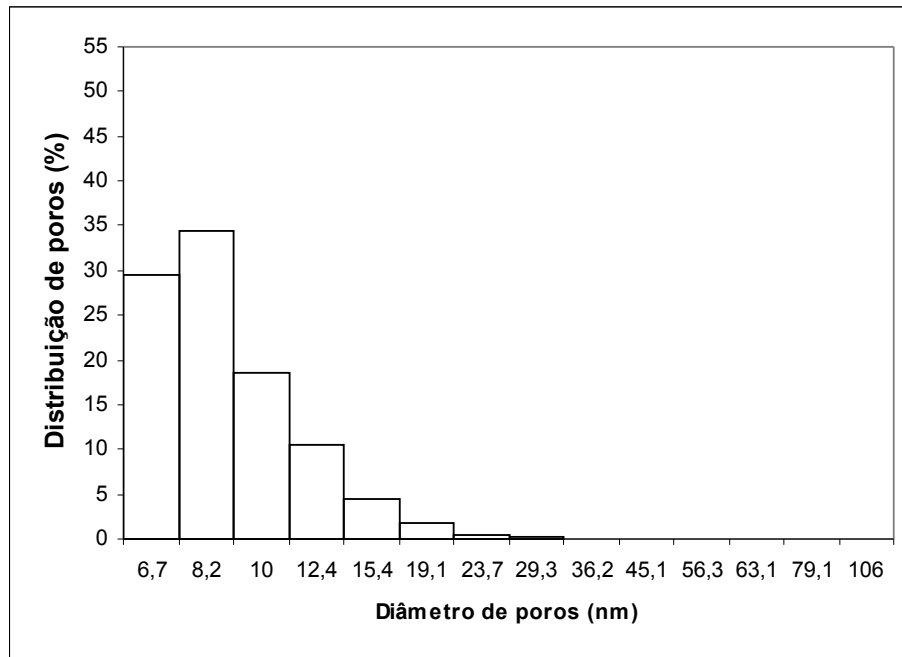


Figura 39: Distribuição média dos poros versus diâmetro dos poros das membranas de polissulfona PSU3 (porosimetria de mercúrio)

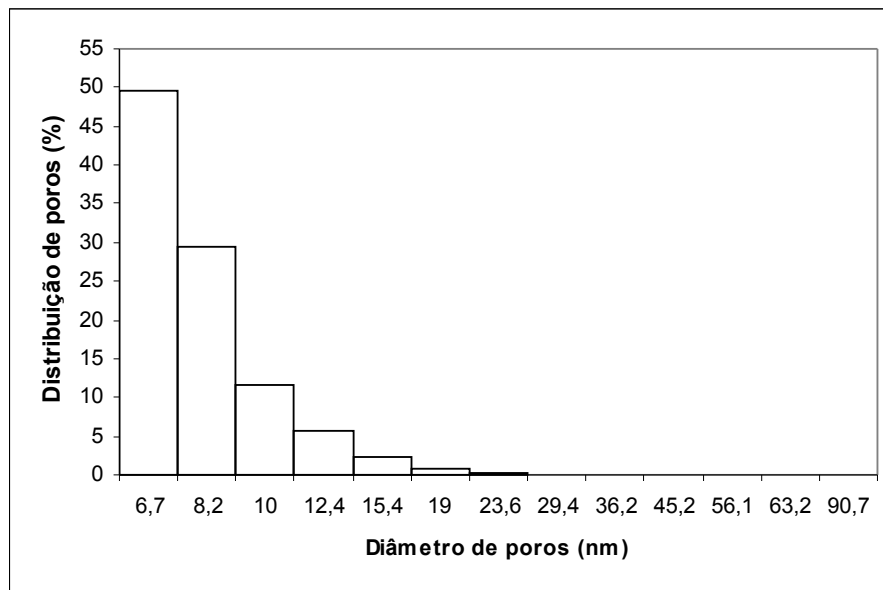


Figura 40: Distribuição média dos poros versus diâmetro dos poros das membranas de polissulfona PSU4 (porosimetria de mercúrio)

Alguns autores como Lee *et. al.* (2003) observaram que com a adição de agentes de nucleação como PVP poli(vinil pirrolidona) a influência sobre a fase de inversão (estrutura polimérica), proporcionam variáveis na estrutura, incluindo porosidade e conseqüentemente permeabilidade.^[78]

As membranas de PSU apresentam poros com diâmetro menor que 100 nm, este diâmetro de poros está na faixa de porosidade obtida em membranas de ultrafiltração (100 nm a 5 nm).^[81]

As membranas produzidas neste trabalho possuem tamanhos de poros semelhantes a membranas comerciais de PSU Diaflo® PM10 e PM 30 da Amicon Corp., que foram analisadas por *Bowell et al.* (1996) por microscopia de força atômica (AFM). Estas membranas apresentam poros com diâmetro de 7,7 nm a 25,7 nm para a membrana PM 10 e 16,7 nm a 62,7 nm para a membrana PM 30.^[81]

Na Tabela 10 são apresentadas algumas propriedades das membranas de PSU, obtidas na porosimetria de mercúrio.

Tabela 10: Propriedades dos filmes de PSU obtidas por porosimetria de mercúrio

Filmes de PSU	PSU4	PSU3	PSU2
Porosidade (%)	85,65	68,16	58,18
Área superficial (m ² .g ⁻¹)	243,69	188,53	145,21
Diâmetro de poro médio (nm)	14,2	15,6	18,0
Variação do diâmetro dos poros (nm)	91 – 6,7	93 – 6,7	79 – 6,7
Quantidade de poros na faixa avaliada (%)	99,999	99,999	99,998

* Análises realizadas na FEQ/UNICAMP

Conforme pode ser observado na Tabela 10, a espessura das membranas de PSU tem forte influência na porosidade e na área superficial. Membranas com menor espessura possuirão menor porosidade e menor área superficial e quanto maior a porosidade maior será a capacidade de permeação da membrana.^[82]

A porosidade das membranas de PSU é muito superior à obtida por *Glavchev et al.* (2003) para membranas de triacetato de celulose (12-22%) e está na faixa das membranas comerciais de PSU que é de 83%.^[4,79]

4.13 Caracterização de enzima livre

A enzima utilizada para imobilização foi a lipase PS da Amano Enzyme Inc. Esta enzima é utilizada para hidrolisar várias gorduras de animais e plantas, também é utilizada para separação de compostos opticamente ativos e em sínteses químicas.^[72]

O método utilizado para determinação da atividade hidrolítica da lipase, foi a hidrólise do PNPA (Figura 41). Cada unidade de atividade enzimática (U) é definida como a quantidade de enzima necessária para hidrolisar 1 μ mol de substrato (PNPA) por minuto.^[63]

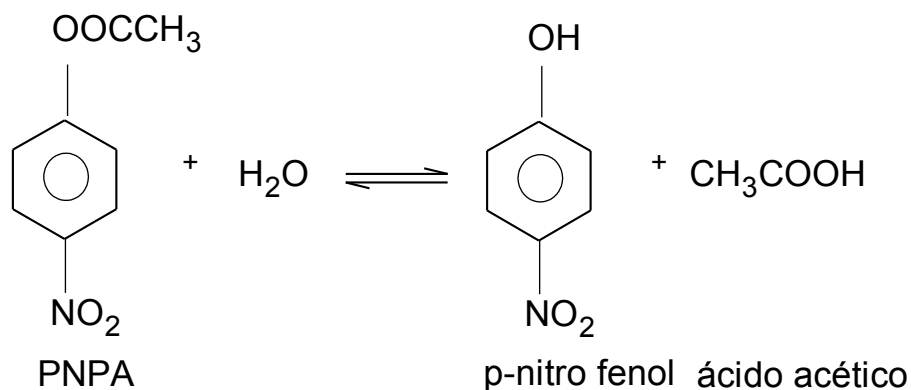


Figura 41: Reação de hidrólise do PNPA^[63]

Nas Figuras 42 e 43, são apresentados, os resultados da cinética para determinação da velocidade máxima de hidrólise do PNPA com lipase livre (V_{max}) e da constante de Michaelis Menten (K_m).

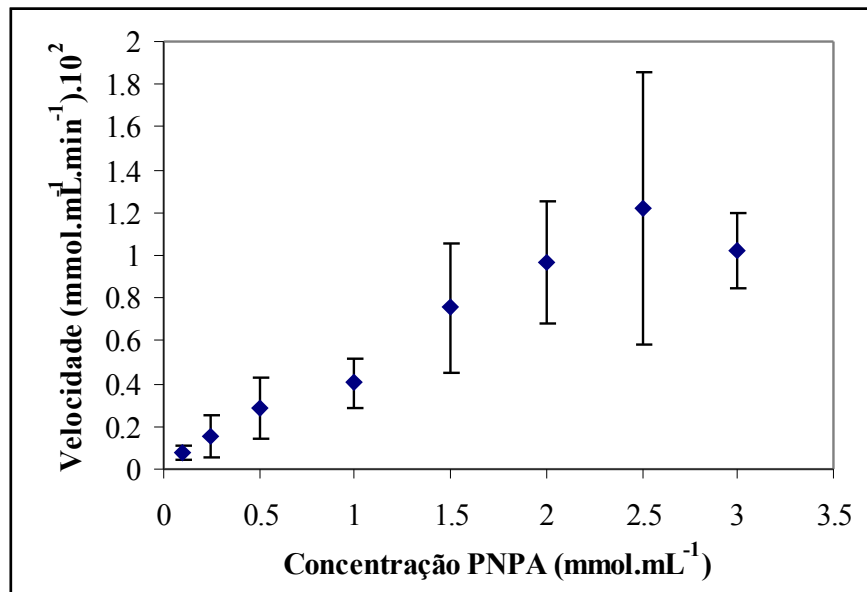


Figura 42: Concentração do substrato (PNPA) versus velocidade de hidrólise do PNPA com lipase livre

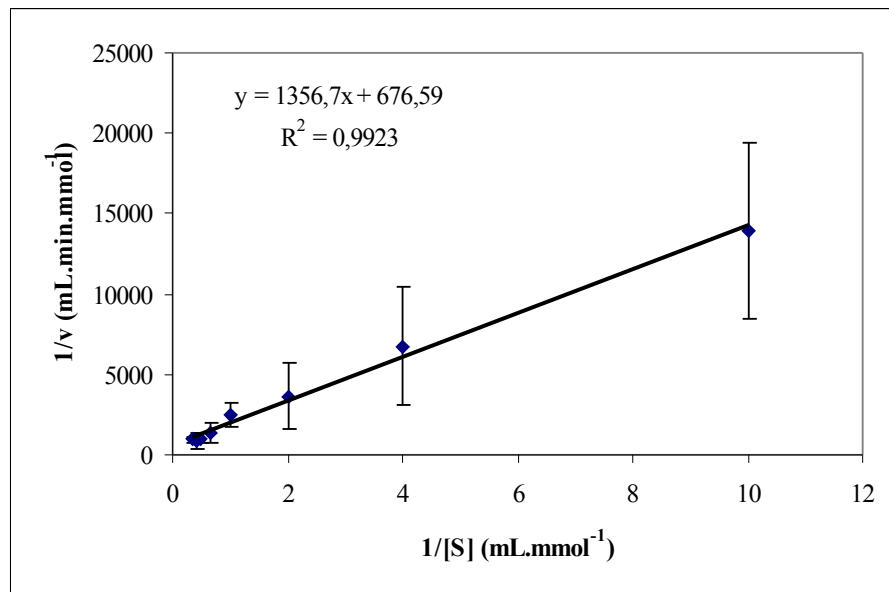


Figura 43: Hidrólise do PNPA - Cinética para determinação da velocidade máxima e da constante de Michaelis Menten

Através da equação obtida na Figura 43, pode-se determinar K_m e a velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) da reação de hidrólise do PNPA, para caracterizar o estado de equilíbrio dinâmico da reação. A constante de Michelis-Menten (K_m) para a reação é $2,005 \text{ mmol.mL}^{-1}$, esta concentração corresponde a concentração de substrato na qual a reação enzimática atinge a metade da velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$) que é $1,478.10^{-3} \text{ mmol.mL}^{-1}.\text{min}^{-1}$.

Com o valor de $V_{m\acute{a}x}$, também pode-se determinar a atividade enzimática máxima para a enzima livre, conforme a equação (8):

$$\text{Atividade enzimática (U} \cdot \text{g}^{-1}) = \frac{V_{\text{max}} \cdot V_{\text{reação}}}{m_{\text{enzima}} \text{ (g)}} \quad (8)$$

onde:

V_{max} = velocidade máxima;

$V_{\text{reação}}$ = volume total da reação (3mL neste trabalho);

m_{enzima} = massa da enzima na reação;

A atividade enzimática foi calculada de duas maneiras: 1) utilizando a velocidade máxima obtida na Figura 42 ($1,22 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot \text{mL}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$) e; 2) utilizando os dados do modelo de Michaelis-Menten (Figura 43).

A atividade obtida para a enzima livre nas condições especificadas (37°C e 5 minutos de reação) foi de $12200 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (Figura 42) e $14780 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ (Figura 43), estes valores, mesmo sendo diferentes evidenciam que o modelo escolhido está correto, pois a diferença se deve ao erro experimental.

A atividade medida para a enzima livre está abaixo da especificada pelo fabricante ($30000 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$).^[72]

4.14 Imobilização da enzima

Nas Figuras 44, 45 e 46 são mostrados os resultados da curva de calibração para determinação da quantidade de enzima imobilizada pelo método de Bradford, os resultados para o rendimento da reação de imobilização da lipase PS nas membranas de PSU e a quantidade de enzima imobilizada nas membranas, com diferentes tempos de imobilização.

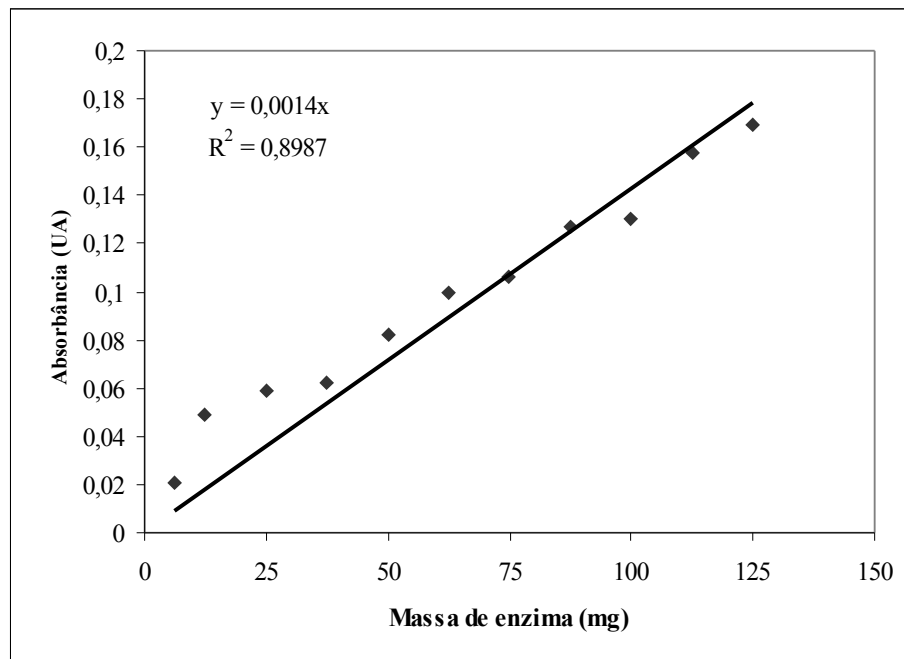


Figura 44: Curva de calibração para determinação da quantidade de lipase PS imobilizada em membranas de PSU (método de Bradford)

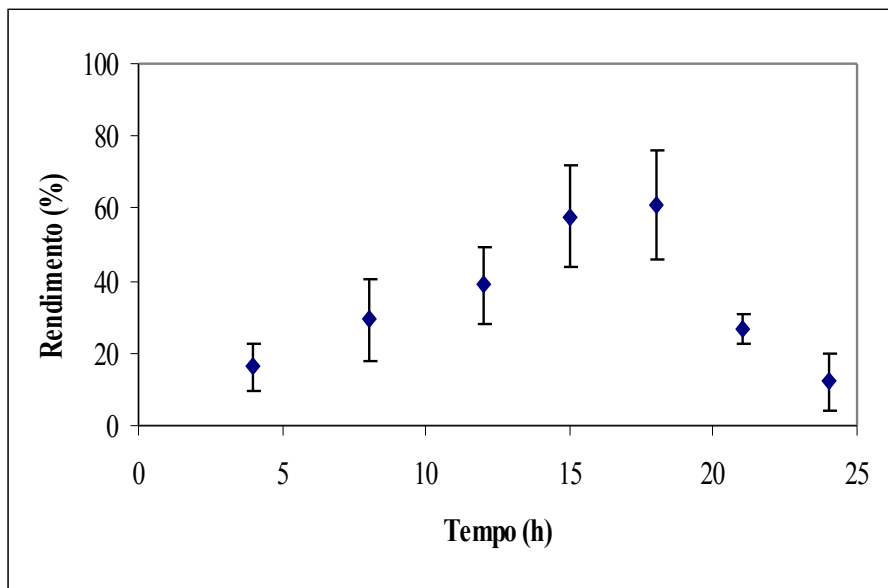


Figura 45: Rendimento da reação de imobilização de lipase PS em filmes de PSU em diferentes tempos com temperatura de 25°C

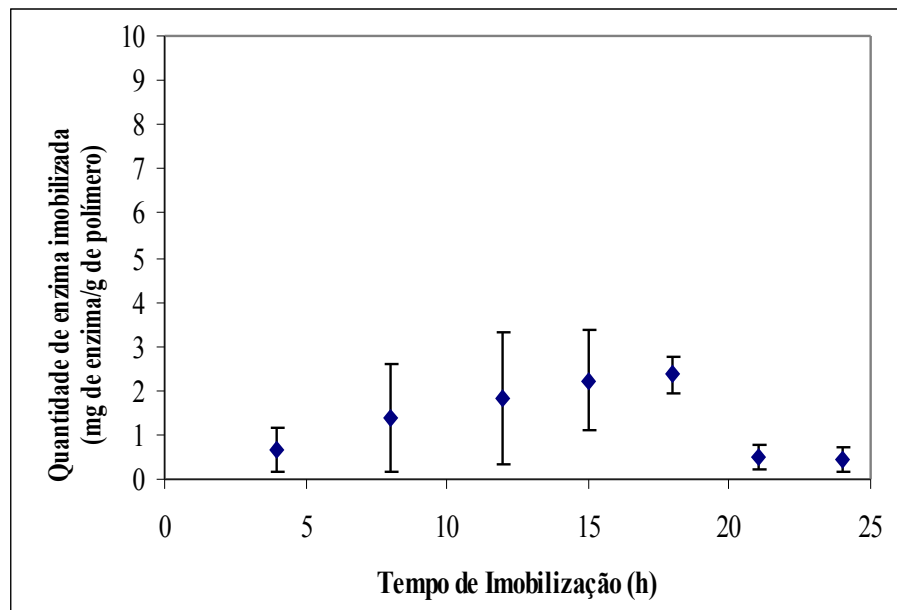


Figura 46: Quantidade de lipase PS imobilizada nas membranas de PSU em diferentes tempos de imobilização

Conforme pode ser observado nas Figuras 45 e 46, o rendimento da reação de imobilização e a quantidade de enzima imobilizada nos filmes de PSU aumentam com a passar do tempo, atingindo um rendimento máximo de $61,2 \pm 15,1\%$ para uma quantidade de enzima imobilizada igual a $2,35 \pm 0,44$ (mg de enzima/g de polímero), em 18 horas de imobilização, valores próximos aos obtidos por Yunus *et. al.* (1996) que imobilizaram lipase em poli(metil metacrilato).^[57] Para tempos maiores que 18 horas a reação de imobilização se

mostrou reversível, ocorrendo um decaimento no rendimento da reação. Com base nesses resultados, foi estipulado um tempo de 18 horas para a imobilização da enzima nos filmes de PSU.

4.15 Atividade enzimática

A atividade enzimática pode ser calculada segundo a equação 9:

$$Atividade (U.g^{-1}) = \frac{\left(\frac{ABS}{\epsilon} \right) \cdot \frac{1000}{t}}{m_{enzima} (g)} \quad (9)$$

onde:

ABS = absorvância;

ϵ = coeficiente de extinção molar (9.123 para a hidrólise do PNPA e leitura em comprimento de onda igual a 410 nm);

t = tempo de reação (5 minutos);

m_{enzima} = massa da enzima presente na reação.

Foi determinada a atividade enzimática para a enzima imobilizada nas membranas de PSU (PSU2), com um tempo de imobilização de 18 horas. Essa atividade foi calculada utilizando a equação (9).

Na Tabela 11, são apresentados os resultados da atividade enzimática para a enzima imobilizada nas membranas PSU2.

Tabela 11: Medidas da atividade enzimática para a lipase PS imobilizada nas membranas de polissulfona PSU2

Absorbância (UA)	Volume de reação (mL)	Massa da membrana (mg)	Massa de enzima imobilizada (mg)	Atividade enzimática (U.g⁻¹)
0,553	21	83,8	0,213	1195
0,583	21	103,1	0,240	1118,3
0,648	21	110,5	0,241	1237,8

Ocorreu perda na atividade da lipase após a imobilização, diminuindo de 14.780 U.g⁻¹ para a enzima livre, para 1.184 ±150 U.g⁻¹ que é a atividade da enzima imobilizada. Este fato já foi mencionado por vários autores,^[57-64] mas esta diminuição foi considerada satisfatória, visto que a enzima ainda manteve 8% da atividade inicial após a imobilização.

Outro fator a ser considerado é que a enzima não será utilizada para realização de atividade hidrolítica, e sim para reconhecimento quiral, e a atividade não será o fator de maior importância neste tipo de utilização, e sim a capacidade de reconhecimento quiral e a capacidade de translocamento.^[80]

5 CONCLUSÕES

A produção de membranas poliméricas de polissulfona (PSU) por inversão de fase requer um controle rigoroso de processo, pois são vários os fatores que poderão interferir nas características finais da membrana produzida.

O solvente (clorofórmio), o não solvente (água), os tempos e as temperaturas utilizados para a inversão de fase não alteraram a estrutura química do polímero conforme análise de infravermelho (FTIR).

A determinação da viscosidade e tensão superficial das soluções de PSU utilizada para a preparação das membranas foram etapas fundamentais para o processo de espalhamento (*casting*) da solução e para o processo de inversão de fase; foram determinantes para inibir alterações estruturais e para controlar tamanho de poros e a porosidade.

As membranas de PSU apresentaram características de permesseletividade e capacidade de troca iônica inferiores à membranas comerciais de eletrodialise Selemion® e membranas de polissulfona sulfonadas, devido a baixa quantidade de grupos trocadores de íons (SO_3^-). Também são hidrofóbicas e apresentam alta resistência à passagem de corrente, fatores indesejados para utilização em processo de eletrodialise (ED).

O diâmetro médio de poros das membranas preparadas foi menor que 100 nm, tamanho de poros usual para membranas de ultrafiltração.

O tamanho de poros obtido (menor que 100 nm), a porosidade (58 a 86%) e principalmente a área superficial das membranas ($145 \text{ a } 244 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$) favoreceram o processo de imobilização, pois suportes com grande área superficial favorecem o acesso da enzima, facilitando a imobilização.

A perda de atividade da lipase imobilizada deve-se principalmente a efeitos estéricos e conformacionais, pois a ligação covalente entre a enzima e o suporte, pode promover um estiramento da molécula da enzima, levando a uma alteração na estrutura tridimensional do

sítio ativo; e podem ocorrer impedimentos estéricos que resultam na dificuldade de acesso do substrato ao sítio ativo da enzima.

6 SUGESTÕES PARA CONTINUIDADE

Utilizar as membranas preparadas para reconhecimento quiral da mistura racêmica do fármaco propranolol em eletrodialise (ED).

Preparar novas membranas de polissulfona (PSU) utilizando agentes de nucleação, por exemplo poli(vinilpirrolidona) (PVP), com a finalidade de conferir maior diâmetro de poros e maior porosidade nas subcamadas da membrana, conferindo a esta uma camada superficial densa com subcamada porosa, facilitando a permeação e fluxo.

Determinar os parâmetros de permeação (seletividade e fluxo) das membranas produzidas.

Sulfonar a PSU com ácido clorosulfônico e clorotrimetil silano para aumentar as características de permeseletividade e capacidade de troca iônica; conferir hidrofília e diminuir a resistência à passagem de corrente.

Testar as membranas produzidas em outros processos de separação, por exemplo ultrafiltração, visando a separação de misturas quirais.

7 BIBLIOGRAFIA

- [1] SCOTT, K. **Handbook of industrial membranes**. Kidlington, UK: Elsevier Advanced Technology, 1995.
- [2] LOEB, S.; SOURIRAJAN, S. U.S. Patent 3, 1964.
- [3] CROSBY, J. (Org.). **Chirality in industry II: Developments in the manufacture and applications of optically active compounds**. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd, 1997, p. 157-180.
- [4] PORTER, M.C. **Handbook of industrial membrane technology**. New Jersey, U.S.A.: Noyes Publications, 1990.
- [5] VAN DE WATER, L.G.A.; MASCHMEYER, T. Mesoporous membranes – a brief overview of recent developments. **Topics in Catalysis**, v. 29, p. 67-77, 2004.
- [6] MAHENDRAN, R.; MALAISAMY, R.; MOHAN, D. Preparation, characterization and effect of annealing on performance of cellulose acetate/sulfonated polysulfone and cellulose acetate/ epoxy resin blend ultrafiltration membranes. **European Polymer Journal**, v. 40, p. 623-633, 2004.
- [7] RIBEIRO, R.M.; BERGAMASCO, R.; GIMENES, M.L., DIAS FILHO, B.P. Preparo de membranas poliméricas para produção de água potável. In: **4º Congresso Ibero-americano em Ciência e Tecnologia de Membranas**, Florianópolis – SC, 2003.
- [8] KROL, J.J. **Monopolar and bipolar ion exchange membranes – mass transport limitations**. Tese de Doutorado, Universidade de Twente, The Netherlands, 1997.
- [9] PARK, H.B.; SHIN, H.S.; LEE, Y.M.; RHIM, J.H. Annealing effect of sulfonated polysulfone ionomer membranes on proton conductivity and methanol transport. **Journal of Membrane Science**, v. 247, p. 103-110, 2005.
- [10] NICOLAISEN, B. Developments in membrane technology for water treatment. **Desalination**, v. 153, p. 355-360, 2002.
- [11] NOUZAKI, K.; NAGATA, M.; ARANI, J.; IDEMOTO, Y.; KOURA, N.; YANAGISHITA, H.; NEGISHI, H.; KITAMOTO, D.; IKEGAMI, T.; HARAYA, K. Preparation of polyacrylonitrile ultrafiltration membranes for wastewater treatment. **Desalination**, v. 144, p. 53-59, 2002.

- [12] PILAT, B. Practice of water desalination by electrodialysis. **Desalination**, v. 138, p. 385-392, 2001.
- [13] WINSTON HO, W.; KOMALESH, K.S. **Membrane Handbook**. Boston: Kluwer Academic Publishers, 2001.
- [14] GOTOR, A.G.; BAEZ, S.O.P.; ESPINOZA, C.A.; BACHIR, S.I. Membrane processes for the recovery and reuse of wastewater in agriculture. **Desalination**, v. 137, p. 187-192, 2001.
- [15] GEKAS, V.; HALLSTRÖM, B.; TRÄG, G. Food and dairy applications: the state of the art. **Desalination**, v. 53, p. 95-127, 1985.
- [16] VAN DER ENT, E.M.; VAN HEE, P.; KEURENTJES, J.T.F.; VAN'T RIET, K.; VAN DER PADT, A. Multistage electrodialysis for large-scale separation of racemic mixtures. **Journal of Membrane Science**, v. 204, p. 173-184, 2002.
- [17] KIKUCHI, K.I.; GOTOH, T.; TAKAHASHI, H.; HIGASHINO, S. Separation of amino acids by electrodialysis with ion-exchange membranes. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 28, p. 103-109, 1995.
- [18] SMITHA, B.; SRIDHAR, S.; KHAN, A.A. Synthesis and characterization of proton conducting polymer membranes for fuel cells. **Journal of Membrane Science**, v. 225, p. 63-76, 2003.
- [19] TUREK, M.; BIA, M.J.; GNOT, W. Utilization of coal mine brines in the chlorine production process. **Desalination**, v. 101, p. 57-67, 1995.
- [20] KIYONO, R.; KOOPS, G.H.; WESSLING, M.; STRATHMANN, H. Mixed matrix microporous hollow fibers with ion-exchange functionality. **Journal of Membrane Science**, v. 231, p. 109-115, 2004.
- [21] TONGWEN, X.; WEIHUA, Y. Industrial recovery of mixed acid (HF + HNO₃) from the titanium spent leaching solutions by diffusion dialysis with a new series of anion exchange membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 220, p. 89-95, 2003.
- [22] SHAPOSHNIK, V.A.; ZUBETS, N.N.; MILL, B.E.; STRIGINA, I.P. Demineralization of water by electrodialysis with ion-exchange membranes, grains and nets. **Desalination**, v. 133, p. 211-214, 2001.
- [23] MISTRY, A. Polysulfones resist heat and chemicals. **Advanced Materials and Process**, v. 12, p. 31-32, 1996.

- [24] AHMAD, A.L.; OOI, B.S.; CHOUDHURY, J.P. Preparation and characterization of co-polyamide thin film composite membrane from piperazine and 3,5-diaminobenzoic acid. **Desalination**, v. 158, p. 101-108, 2003.
- [25] OCHOA, N.A.; MARCHESE, J. Preparacion de membranas porosas cargadas. In: **4º Congresso Ibero-americano em Ciência e Tecnologia de Membranas**, Florianópolis – SC, 2003.
- [26] DOYEN, W.; ANDRIANSENS, W.; MOLENBERGHS, B.; LEYSEN, R. A comparison between polysulfone, zirconia and organo-mineral membranes for use in ultrafiltration. **Journal of Membrane Science**, v. 113, p. 247-258, 1996.
- [27] DALLA COSTA, R.F.; KLEIN, C.W.; BERNARDES, M.; FERREIRA, J.P. Evaluation of the electrodialysis process for the treatment of metal finishing wastewater. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 540-547, 2002.
- [28] MAINER, N.M.; FRANCO, P.; LINDNER, W. Separation of enantiomers: needs, challenges, perspectives. **Journal of Chromatography A**, v. 906, p. 3-33, 2001.
- [29] GAO, Y.; HANSON, R. M.; KLUNDER, J. M.; KO, S. Y.; MASAMUNE, H.; SHARPLESS, K. B. Catalytic asymmetric epoxidation and kinetic resolution: modified procedures including in situ derivatization. **Journal of the American Chemical Society**, v.109, p. 5765-5780, 1987.
- [30] BADDELEY, C.J. Fundamental investigations of enantioselective heterogeneous catalysis. **Topics in Catalysis**, v.25, p. 1-4, 2003.
- [31] MILLOT, M.C. Separation of drug enantiomers by liquid chromatography and capillary electrophoresis, using immobilized proteins as chiral selectors. **Journal of Chromatography B**, v. 797, p. 131-159, 2003.
- [32] NAZARETH, P.M.P.; ANTUNES, O.A.C. Chiral ligand exchange chromatography: separation of enantiomeric mixture of underivatized α -amino acids under UV detection. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, p. 658-663, 2002.
- [33] HOLOWNIA, A.T. A catalytic membrane for hydrolysis reaction carried out in the two-liquid phase system – Membrane preparation and characterisation, mathematical model of the process. **Journal of Membrane Science**, v. 259, p. 74-84, 2005.
- [34] HADIK, P.; SZABÓ, L.P.; NAGY, E. D,L-lactic acid and D,L-alanine enantioseparation by membrane process. **Desalination**, v. 148, p. 193-198, 2002.

- [35] HADIK, P.; SZABÓ, L.P.; NAGY, E.; FARKAS, Z. Enantioseparation of D,L- lactic acid by membrane techniques. **Journal of Membrane Science**, v. 251, p. 223-232, 2005.
- [36] YAMAMOTO, C.; OKAMOTO, Y. Optically active polymers for chiral separation. **Bulletin of the Chemical Society of Japan**, v. 77, p. 227-257, 2004.
- [37] YOSHIKAWA, M.; YONETANI, K. Molecularly imprinted polymeric membranes with oligopeptide tweezers for optical resolution. **Desalination**, v. 149, p. 287-292, 2002.
- [38] KEURENTJES, J.T.F.; NABUURS, L.J.M.; VEGTER, E.A. Liquid membrane technology for the separation of racemic mixtures. **Journal of Membrane Science**, v. 113, p. 351-360, 1996.
- [39] PONCET, S.; RANDON, J.; ROCCA, J.L. Enantiomeric separation of tryptophan by ultrafiltration using the BSA solution system. **Separation Science Technology**, v. 32, p. 2029-2038, 1997.
- [40] TOCCI, E.; FAMÀ, A.; PERRONE, M.P.; RUSSO, N.; DRIOLI, E. A molecular simulations study of beta-cyclodextrin polymeric membranes. In: 4th Korea-Italy Workshop on Membranes and Membrane Processes for the clean Environment and Clean Energy, 2003, Yongpyung, Korea. **Anais...** p. 57-59.
- [41] THOELLEN, C.; DE BRUYN, M.; THEUNISSEN, E.; KONDO, Y.; VANKELECOM, I.F.J.; GROBET, P.; YOSHIKAWA, M.; JACOBS, P.A. Membranes based on poly(γ -methyl-L-glutamate): synthesis, characterization and use in chiral separations. **Journal of Membrane Science**, v. 186, p. 153-163, 2001.
- [42] KIM, J.H.; KIM, J.H.; JEGAL, J.; LEE, K.H. Optical resolution of α -amino acids through enantioselective polymeric membranes based on polysaccharides. **Journal of Membrane Science**, v. 213, p. 273-283, 2003.
- [43] WAN, Y.; WEN, D. Preparation and characterization of porous conducting poly(DL-lactide) composite membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 246, p. 193-2001, 2005.
- [44] GIORNO, L.; NA, L.; DRIOLI, E. Application of stable emulsions to lipase immobilized membrane reactors for kinetic resolution of racemic esters. In: 4th Korea-Italy Workshop on Membranes and Membrane Processes for the clean Environment and Clean Energy, 2003, Yongpyung, Korea. **Anais...** p. 11-16.
- [45] LAKSHMI, B.B.; MARTIN, C.R. Enantioseparation using apoenzymes immobilized in a porous polymeric membrane. **Nature**, v. 388, p. 758-760, 1997.

[46] HIGUCHI, A.; FURUTA, K.; YOMAGITA, H.; YOON, B.O.; HARA, M.; MANIWA, S.; SAITOH, M. Optical resolution of amino acid by ultrafiltration through immobilized DNA membranes. **Desalination**, v. 148, p. 155-157, 2002.

[47] KONDO, Y.; YOSHIKAWA, M. Effect of solvent composition on chiral recognition ability of molecularly imprinted DIDE derivatives. **The Analyst**, v. 126, p. 781-783, 2001.

[48] YOSHIKAWA, M.; KONDO, Y.; MORITA, Y. Relationship between enantioselectivity of alternative molecularly imprinted polymeric membranes and species of amino acids residues composing chiral recognition sites. **Bioseparation**, v. 10, p. 323-330, 2002.

[49] REDDY, P.S.; KOBAYASHI, T.; FUJII, N. Recognition characteristics of dibenzofuran by molecularly imprinted polymers made of common polymers. **European Polymer Journal**, v. 38, p. 779-785, 2002.

[50] SAID, S.; PIETRO, R. **Enzimas Como Agentes Biotecnológicos**. Editora Legis Summa, Ribeirão Preto, 2004.

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

[52] BRYJAK, J.; BACHMANN, K.; PAWLÓW, B.; MALISZEWSKA, I.; TROCHIMCZUK, A.; KOLARZ, B.N. Immobilization of lipase on various acrylic copolymers. **Chemical Engineering Journal**, v. 65, p. 249-256, 1997.

[53] MORENO, J.M.; ARROYO, M.; HERNÁIZ, J.M.; SINISTERRA, J.V. Covalent Immobilization of pure isoenzymes from lipase of *Candida rugosa*. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 21, p. 552-558, 1997.

[54] CANO, A.; MINGUILLÓN, C.; PALET, C. Immobilization of endo-1,4- β -xylanase on polysulfone acrylate membranes: Synthesis and characterization. **Journal of Membrane Science**, article in press.

[55] OLIVEIRA, P.C.; ALVES, G.M.; CASTRO, H.F.; MEI, L.H.I. Síntese do butirato de n-butila empregando lipase microbiana imobilizada em copolímero de estireno-divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 23, p. 632-636, 2000.

[56] CARTA, G.; GAINER, J.L.; BENTON, A.H. Enzymatic Synthesis of Esters using immobilized lipase. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 37, p. 1004-1009, 1991.

- [57] YUNUS, W.M.Z.W.; SALLEH, A.B.; BASRI, M.; AMPON, K.; RAZAK, C.N.B. Preparation and immobilization of lipase on to poly(methyl acrylate-methyl metacrylate-divinylbenzene) beads for lipid hydrolysis. **Biotechnology Applied Biochemistry**, v. 24, p. 19-23, 1996.
- [58] LYE, G.J.; PAVLOU, O.P.; ROSJIDI, M.; STUCKEY, D.C. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on colloidal liquid aphrons (CLAs) and development of a continuous CLA-membrane reactor. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 51, p. 69-78, 1996.
- [59] XU, H.; LI, M.; HE, B. Immobilization of *Candida cylindracea* lipase on methyl acrylate-divinyl benzene copolymer and its derivatives. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 17, p. 194-199, 1995.
- [60] MURRAY, M.; ROONEY, D.; VAN NEIKERK, M.; MONTENEGRO, A.; WEATHERLEY, L.R. Immobilization of lipase onto lipophilic polymer particles and application to oil hydrolysis. **Process Biochemistry**, v. 22, p. 479-786, 1997.
- [61] MORENO, J.M.; HERNAIZ, M.J.; MONTERO, J.M.S.; SINISTERRA, J.V.; BUSTOS, M.T.; SÁNCHEZ, M.E.; BELLO, J.F. Covalent immobilization of pure lipases A and B from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 2, p. 177-184, 1997.
- [62] LUCARINI, A.C.; MARINO, R.B.F. Imobilização de lipase por ligação covalente em suporte de sílica ativado. **Revista Pesquisa e Tecnologia FEI**, v. 19, p. 18-23, 1999.
- [63] MONTERO, S.; BLANCO, A.; VIRTO, M.D.; LANDETA, L.C.; AGUD, I.; SOLOZABAL, R.; LASCARAY, J.M.; RENOBALLES, M.; LLAMA M.J.; SERRA, J.L. Immobilization of *Candida rugosa* lipase and some properties of the immobilized enzyme. **Enzyme Microbiology and Technology**, v. 15, p. 239-247, 1993.
- [64] KRAMER, G.F.H.; BATENBURG, L.; DERKSEN, J.T.P.; CUPERUS, F.P. A convenient activity assay for immobilized lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 3, p. 121-125, 1997.
- [65] YANG, F.; WEBER, T.W.; GAINER, J.L.; CARTA, G. Synthesis of lovastatin with immobilized *Candida rugosa* lipase in organic solvents: effects of reaction conditions on initial rates. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 56, p. 671-680, 1997.
- [66] STOSCHITZKY, K.; ZERNIG, G.; LINDNES, W. Racemic beta-blockers – fixed combinations of different drugs. **Journal of Clinical and Basic Cardiology**, v. 1, p. 15-19, 1998.

[67] CABALLERO, R.R.; GONZÁLEZ, R.A.; LAVAUT, J.A.G. Propranolol y sus esters: detección y resolución enantiomérica. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 32, p. 130-139, 1998.

[68] HEARD, C.M.; HADGRAFT, J.; BRAIN, K.R. Differential facilitated transfer across a solid-supported liquid membrane. **Bioseparation**, v. 4, p. 111-116, 1996.

[69] CHIOU, T.W.; CHANG, C.C.; LAI, C.T.; TAI, D.F. Kinetic resolution of propranolol by a lipase-catalyzed N-acetylation. **Bioorganic e Medical Chemistry Letters**, v. 7, p. 433-436, 1997.

[70] SIGMA-ALDRICH S.A. Catálogo de produtos. Disponível em : <<http://www.sigma.com.br>>. Acesso em: junho de 2006.

[71] ASAHI GLAS COMPANY Catálogo de produtos. Disponível em: <<http://www.agc.co.jp>>. Acesso em: julho de 2006.

[72] AMANO ENZIME INC. Catálogo de produtos. Disponível em: <<http://www.amano.com>>. Acesso em: junho de 2006.

[73] BRADFORD, M.M. A rapid e sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

[74] KNIGHT, K.; PIMENTEL, M.C.B.; MORAIS, M.M.C.; LEDINGHAM, W.M.; LIMA FILHO, J.L.; MAIA, M.M.D. Immobilization of lipase form *Fusarium solari* FS1. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, p. 220-222, 2000.

[75] OLIVEIRA, O.F.; FURLAN, M.; FRANÇA, S.C.; CORSINO, J.; MORAES, M.A.; LEITE, K.; ASSIS, S.; KHALIL, N. Determinação de Km e V_{máx} de peroxidases de diferentes fontes. In: **IV Seminário Brasileiro de Tecnologia Enzimática**. Rio de Janeiro. Resumos. p. 12, 1999.

[76] LUCAS, E.F.; SOARES, B.G.; MONTEIRO, E. **Caracterização de Polímeros - Determinação de Peso Molecular e Análise Térmica**. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais, p. 217-307, 2001.

[77] YANG, M.H. On the thermal degradation of polysulfones XI. Synthesis and thermal degradation behaviour of poly(vinyl chloride sulfone). **Polymer Degradation and Stability**, v. 78, p. 237-250, 2002.

[78] LEE, K.H.; SEO, B.K.; NAM, S.T.; HAN, M.J. Trade-off between thermodynamic enhancement and kinetic hindrance during phase inversion in the preparation of polysulfone membranes. **Desalination**, v. 159, p. 289-296, 2003.

[79] GLAVCHEV, I.; NIKOLOV, R.N.; VALCHEV, P. Determination of evaporation rates of mixed solvents with the formation of thin film for membranes. **Polymer Testing**, v. 22, p. 529-532, 2003.

[80] WANG, J.; FU, C.; LIN, T.; YU, L.; ZHU, S. Preparation of chiral selective membranes for electrodialysis separation of racemic mixture. **Journal of Membrane Science**, v. 276, p. 193-198, 2006.

[81] BOWELL, W.R.; HILAL, N.; LOVITT, R.W.; WUILLIAMS, P.M. Atomic force microscope studies of membranes: surface pore structures of diaflo ultrafiltration membranes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 180, p. 350-359, 1996.

[82] GUMÍ, T.; KLULBE, K.C.; PALET, C.; MATSUURA, T. Characterization of activated composite membranes by solute transport, contact angle measurement, AFM and ESR. **Journal of Membrane Science**, v. 212, p. 123 – 134, 2003.

ANEXO – TRABALHOS PUBLICADOS EM CONGRESSO

