

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 21/02/2021.

GABRIEL CARDOSO PINTO

Óxido de grafeno magnético: uma estratégia para imobilização de lipases

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Miguel Jafelicci Junior

Araraquara
2019

FICHA CATALOGRÁFICA

P659o Pinto, Gabriel Cardoso
Óxido de grafeno magnético: uma estratégia para
imobilização de lipases / Gabriel Cardoso Pinto. –
Araraquara : [s.n.], 2019
76 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química

Orientador: Miguel Jafelicci Junior

1. Grafeno. 2. Lipase. 3. Nanopartículas. 4. Enzimas
imobilizadas. 5. Biocatálise. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Óxido de grafeno magnético: uma estratégia para imobilização de lipases"

AUTOR: GABRIEL CARDOSO PINTO

ORIENTADOR: MIGUEL JAFELICCI JUNIOR

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MIGUEL JAFELICCI JUNIOR
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. ANTONIO CARLOS GUASTALDI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia / Universidade de Araraquara - UNIARA - Araraquara

Araraquara, 21 de fevereiro de 2019

DADOS CURRICULARES

IDENTIFICAÇÃO

Nome: Gabriel Cardoso Pinto

Nome em citações bibliográficas: PINTO, G.C.

ENDEREÇO PROFISSIONAL

Rua Prof. Francisco Degni, 55, Quitandinha, 14800-060, Araraquara, SP

FORMAÇÃO ACADÊMICA

Bacharel em Química, concluído em 2016, no Unisalesiano Araçatuba.

PRODUÇÃO BIBLIOGRÁFICA

Apresentação de seminário na V edição do CIC – FAI com menção honrosa sobre “Síntese e caracterização de nanopartículas funcionalizadas”, 2016.

Pinto, G. C., Bitencourt, D.A. Avaliação da Gasolina Comum Tipo C Comercializada em Araçatuba SP. UNIVERSITAS (ARAÇATUBA), v.8, p.351 - 363, 2016.

Silva, D.F.P., Pinto, G. C. de Queiroz, V.H.P., Bastos, A.C. Reaproveitamento de resíduo sólido: Revisão bibliográfica das aplicações da casca de ovo. UNIVERSITAS (ARAÇATUBA), v.8, p.364 - 374, 2016.

LUCENA, G.N., DOS SANTOS, C.C., PINTO, G.C., DA ROCHA, C.O., BRANDT, J.V., DE PAULA, A.V., JAFELICCI, M.J., MARQUES, R. F. C. Magnetic cross-linked enzyme aggregates (MCLEAS) applied to biomass conversion. Journal of Solid-State Chemistry, v. 270, p. 58-70. 2018.

Apresentação Oral “Magnetic graphene oxide as support for lipase immobilization,” , XVII Brazilian Materials Research Society meeting, Natal, setembro 2018.

PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS CIENTÍFICOS

XVII Brazilian Materials Research Society meeting, Natal, setembro 2018.

AGRADECIMENTOS

Dedico esse trabalho a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para com ele.

Meus pais, eternos guias, pessoas que me apoiam incondicionalmente, o meu mais sincero obrigado por estarem comigo em mais uma empreitada, dedico essa dissertação a vocês.

Aos amigos, tanto aos antigos de Araçatuba quanto aos novos, feitos na Morada do Sol, obrigado pela força, incentivo e por tornarem meus dias mais agradáveis, dedico essa dissertação a vocês.

Professor Miguel, obrigado por me receber de braços abertos como orientando, por todos os ensinamentos e pelo auxílio no crescimento científico, dedico essa dissertação a você.

Professor Rodrigo, ou mais conhecido como Jata, obrigado por acreditar no meu potencial lá em 2016, por toda confiança e alto astral contagiante, dedico essa dissertação a você.

Incluo também a Professora Ariela, obrigado por sua atenção, preocupação e carinho, dedico essa dissertação a você.

Membros do LaMMC, meu mais sincero obrigado. Gostaria de agradecer, de forma especial, o Bruno, Caio, Chico, Gibbs, Luísa e Pelé. Sem dúvida vocês provaram que eu entrei no melhor grupo de pesquisa da UNESP, dedico essa dissertação a vocês.

Obrigado CAPES, pela bolsa concedida, pelo Instituto de Química e todos os funcionários que colaboraram direta ou indiretamente.

*“O insucesso é apenas uma oportunidade para
recomeçar de novo com mais
inteligência.”*

Henry Ford

RESUMO

A utilização da enzima lipase em processos industriais é crescente, devido a capacidade de catalisar reações de hidrólise total ou parcial de acil ésteres de cadeia longa, podendo assim ser empregadas em tratamento de resíduos oleosos, cosméticos, preparo de detergentes e surfactantes e na produção de biodiesel. No entanto a dificuldade de isolamento e purificação das enzimas lipases, assim como a dificuldade de separação do meio reacional, a torna um insumo caro. Com a finalidade de tornar este processo economicamente mais vantajoso, nos últimos anos tem se intensificado o uso de diferentes tipos de suportes enzimáticos, para melhorar a estabilidade durante estocagem, aumentar a atividade catalítica, além da possibilidade da utilização de suportes que permitem o reciclo da enzima. Neste trabalho optou-se por utilizar como suporte para enzimas o óxido de grafeno, este foi obtido a partir da modificação do grafite, utilizando o método de Hummers modificado, que por meio de agentes oxidantes separaram as lamelas da estrutura do grafite e adicionam em sua estrutura diferentes grupos oxigenados. O caráter magnético do suporte foi adquirido pela síntese de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro diretamente nas folhas de óxido de grafeno, possibilitando sua remoção a partir da aplicação de um campo magnético externo. Óxido de grafeno decorado com nanopartículas magnéticas foi modificado com grupos aminosilanos para posterior imobilização de lipase através de ligações cruzadas com glutaraldeído. Técnicas de caracterização, tais como: RAMAN, DRX e FEG-MEV possibilitaram a identificação da estrutura e morfologia dos compostos obtidos. Nos ensaios de atividade hidrolítica relativa foram determinados o pH e temperatura ótima para três diferentes tipos de lipases imobilizadas, sendo estes 37°C e pH 8 (Lipase pancreática suína), 50°C e pH 6 (Lipase de *Candida rugosa* e 40°C e pH 9 (Lipase de *Aspergillus niger*). O teste de recuperação enzimática apresentou a capacidade de reciclo da lipase pancreática suína imobilizada em até seis vezes, sem perdas significativas na atividade catalítica.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Imobilização de enzimas. Óxido de grafeno.

ABSTRACT

The use of the lipase enzyme in industrial processes is increasing due to its ability to catalyze total or partial hydrolysis reactions of fatty acids, allowing it to be used in oily residues treatment, cosmetics, detergents, surfactants and in biodiesel production. However, due to the difficulty of isolation and purification of lipases, as well as the separation of the reaction medium, it becomes an expensive input. In order to make this process more economically advantageous, in the last years the use of different types of enzyme supports has been intensified because they promote new characteristics of the enzyme of interest, such as, improved storage stability, increased catalytic activity, added to the possibility of being recycled. In this study it was used graphene oxide as support for enzymes. Graphene Oxide was obtained from the modification of graphite, using the modified Hummers method. The magnetic properties of the support were obtained through surface decoration with magnetic iron oxide nanoparticles directly on the sheets of graphene oxide. RAMAN, XRD and SEM were used to elucidate the structure and morphology of the compounds obtained. By measuring hydrologic activity, it was possible to determine the optimum pH and temperature for three different types of immobilized lipases, being 37 °C and pH 8 (porcine pancreatic lipase), 50 °C and pH 6 (*Candida rugosa* lipase and 40 °C and pH 9 (*Aspergillus niger* lipase). The enzymatic recovery test showed the immobilized porcine pancreatic lipase can be recycled six times, without significant loss of catalytic power.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Immobilization of enzymes. Graphene oxide.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Grafeno como precursor para outras estruturas grafíticas.	15
Figura 2 - Métodos <i>bottom-up</i> e <i>top-down</i> para obtenção de grafeno.	16
Figura 3 - Estrutura da folha de óxido de grafeno com grupos funcionais epoxil, carboxil, carbonil e hidroxil utilizando o modelo teórico de Hofmann.	17
Figura 4 - Esquemática dos múltiplos domínios magnéticos e suas paredes.	19
Figura 5 – Domínios magnéticos em função da dimensão do material.	20
Figura 6 - Estrutura cristalina da magnetita.	20
Figura 7 - Estrutura de óxido de grafeno magnético (OGM) (núcleos de NPM em vermelho).	21
Figura 8 – Conformações da enzima lipase.	22
Figura 9 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica.	23
Figura 10 – Reações catalisadas por lipases.	24
Figura 11 – Métodos de imobilização de enzimas.	26
Figura 12 – (A) Processo de oxidação e exfoliação do precursor grafite; (B) Adição de nanopartículas magnéticas nas folhas de grafeno oxidada; (C) Imobilização química de lipases na estrutura de óxido de grafeno magnético.	31
Figura 13 - Esquema de obtenção de óxido de grafeno.	35
Figura 14 - (A) Amostra de grafite. (B) Amostra de óxido de grafite. (C) Amostra de óxido de grafeno.	36
Figura 15 - Curva termogravimétrica da amostra de grafite.	37
Figura 16 - Curvas termogravimétricas da amostra de óxido de grafeno.	38
Figura 17 - Curvas termogravimétricas das amostras de grafite e óxido de grafeno.	39
Figura 18 - Difractogramas de raios x das amostras de grafite e óxido de grafeno.	40
Figura 19 – Micrografias eletrônicas de varredura das folhas de óxido de grafeno A e B (primeira síntese), C, D e E (segunda síntese).	41
Figura 20 - Espectro Raman das amostras de OGT e OG.	42
Figura 21 - Deconvoluções dos espectros de Raman de (A) OGT e (B) OG.	43
Figura 22 - Espectros na região do Infravermelho das amostras de grafite e óxido de grafeno.	45
Figura 23 – (A) Amostra antes da aplicação do imã; (B) Amostra após da aplicação do imã.	46

Figura 24 - Difratoograma de Raios X comparando o padrão magnetita com as amostras de óxido de grafeno magnético e óxido de grafeno magnético funcionalizado.	47
Figura 25 - Espectro Raman das amostras (A) OGM e (B) OGM@APTES.....	48
Figura 26 - Deconvoluções dos espectros de Raman de OGM e OGM@APTES.	48
Figura 27 - Espectros na região do Infravermelho das amostras OGM e OGM@APTES.	50
Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras de OGM. (A) magnificação de 20 mil; (B) 50 mil; (C) 100 mil.....	51
Figura 29 - Relação do número de NP de óxido de ferro com o diâmetro (nm).....	52
Figura 30 - Espectro na região do Infravermelho Raman das amostras de OGM@APTES@LPP, OGM@APTES@LCR e OGM@APTES@LAN.	53
Figura 31 - Espectro Raman das amostras de OGM@APTES@LPP, OGM@APTES@LCR e OGM@APTES@LAN.....	54
Figura 32 – Deconvolução dos espectros Raman das amostras (A) OGM@APTES@LPP, (B) OGM@APTES@LCR e (C) OGM@APTES@LAN.....	55
Figura 33 - Atividade catalítica da LPP em função do pH.....	57
Figura 34 - Atividade catalítica da LPP em função da temperatura.	58
Figura 35 - Atividade catalítica da LCR em função do pH.	59
Figura 36 - Atividade catalítica da LCR em função da temperatura.....	60
Figura 37 - Atividade catalítica da LAN em função do pH.....	61
Figura 38 - Atividade catalítica da LAN em função da temperatura.....	62
Figura 39 – Reutilização da amostra OGM@APTES@LPP.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Combinação de óxido de grafeno com outros materiais e suas aplicações... 18	18
Tabela 2: Reações catalisadas por lipases e suas principais aplicações 24	24
Tabela 3 – Valores de I_D/I_G das amostras OGT e OG..... 44	44
Tabela 4 – Valores de I_D/I_G das amostras OGM e OGM@APTES. 49	49
Tabela 5 - Valores de I_D/I_G das amostras OGM@APTES@LPP, OGM@APTES@LCR, OGM@APTES@LAN. 56	56
Tabela 6: Valores de pH e temperatura ótima das lipases estudadas. 62	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTES	3-aminopropiltriétoxisilano
Asp	Asparagina
Glu	Glutamina
His	Histidina
LAN	Lipase de <i>Aspergillus niger</i>
LCR	Lipase de <i>Cândida rugosa</i>
LPP	Lipase pancreática suína
NP	Nanopartículas
NPM	Nanopartículas magnéticas
OG	Óxido de grafeno
OGM	Óxido de grafeno magnético
OGT	Óxido de grafite
OGM@APTES	Óxido de grafeno magnético funcionalizado com 3 aminopropiltriétoxisilano
OGM@APTES@LAN	Lipase de <i>Aspergillus niger</i> imobilizada em óxido de grafeno magnético funcionalizado com 3 aminopropiltriétoxisilano
OGM@APTES@LCR	Lipase de <i>Cândida rugosa</i> imobilizada em óxido de grafeno magnético funcionalizado com 3 aminopropiltriétoxisilano
OGM@APTES@LPP	Lipase pancreática suína imobilizada em óxido de grafeno magnético funcionalizado com 3 aminopropiltriétoxisilano
Ser	Serina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 Grafeno	15
1.2 Óxido de grafeno	16
1.3 Nanopartículas de óxido de ferro.....	19
1.4 Lipases.....	21
1.5 Processo de imobilização	25
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivos específicos	28
3. PARTE EXPERIMENTAL	29
3.1 Reagentes utilizados	29
3.2 Métodos	29
3.2.1 Síntese de óxido de grafeno	29
3.2.2 Síntese de óxido de grafeno magnético.....	29
3.2.3 Imobilização de lipase no suporte magnético.....	30
3.3 Caracterizações	32
3.3.1 Análise térmica por TG/DTA	32
3.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho	32
3.3.3 Difração de raios X	32
3.3.4 Espectroscopia Raman.....	32
3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura	33
3.3.6 Atividade hidrolítica de lipase imobilizada e livre	33
3.3.7 Estabilidade operacional.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
4.1 Síntese de óxido de grafeno.....	35
4.1.1 Análise térmica por TG/DTA	37
4.1.2 Difração de raios X	39
4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura	40
4.1.4 Espectroscopia Raman.....	42
4.1.5 Espectroscopia na região do infravermelho	44
4.2 Síntese do óxido de grafeno magnético	45
4.2.1 Difração de raios X	46
4.2.2 Espectroscopia Raman.....	47
4.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho	49
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura	51
4.3 Imobilização de Lipases	52

4.3.1	Espectroscopia na região do infravermelho	53
4.3.2	Espectroscopia Raman.....	54
4.3.3	Atividade hidrolítica relativa das lipases imobilizadas em OGM@APTES.....	56
4.3.3.1	Lipase Pancreática Suína.....	56
4.3.3.2	Lipase e <i>Cândida rugosa</i>	58
4.3.3.3	Lipase de <i>Aspergillus niger</i>	60
4.4	Estabilidade operacional	63
5.	CONCLUSÕES	65
6.	PERSPECTIVAS.....	66
	REFERÊNCIAS	67

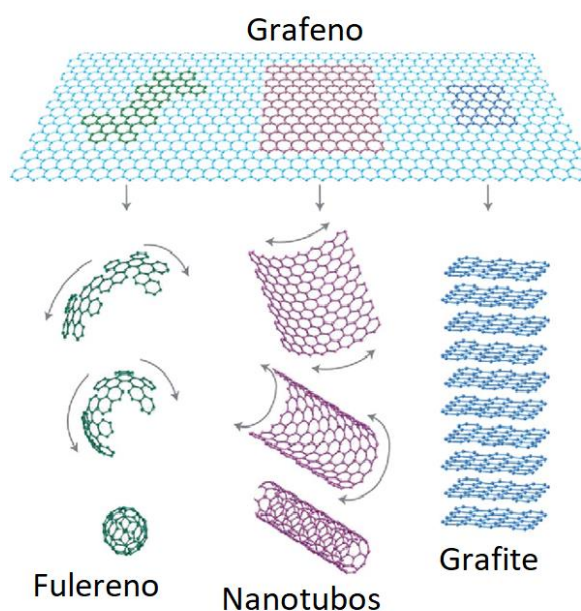
1. INTRODUÇÃO

1.1 Grafeno

O grafeno, um dos alótropos do carbono, é um material multifuncional muito estudado, com várias aplicações relacionadas as suas características estruturais, mecânicas, térmicas, elétricas ^{1,2}. Desde 2004, ano de sua descoberta por A. K. Geim e K. S. Novoselov, cientistas ganhadores do prêmio Nobel de Física de 2010, o grafeno é considerado como o material mais fino e resistente que se tem conhecimento ³.

Os filmes, ou folhas de grafeno, que segundo a IUPAC são denominados como sendo hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, se dispõem em uma estrutura hexagonal de átomos de carbonos com hibridização sp^2 bidimensional dotada de fracas ligações secundárias entre os planos ⁴. O grafeno serve de base para a construção de outros alótropos do carbono, como nanotubos de carbono, fulereno e grafite, como esquematizado na Figura 1.

Figura 1 - Grafeno como precursor para outras estruturas gráficas.

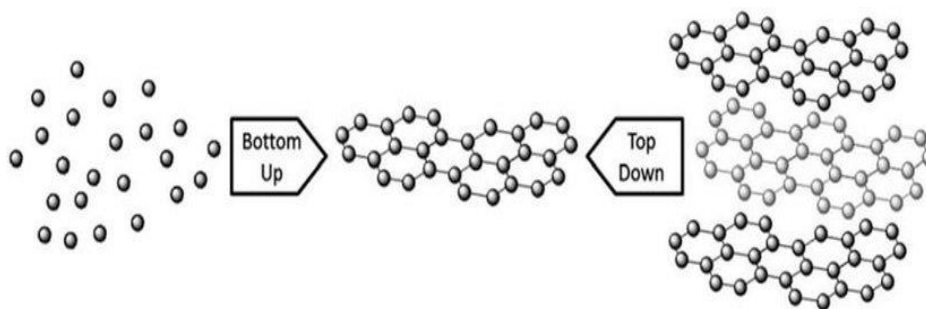


Fonte: Adaptado de Zhang *et al*, 2012 ⁵.

O grafeno pode ser obtido através dos métodos *bottom-up* e *top-down*, como apresentado na Figura 2. O primeiro emprega a manipulação de pequenas moléculas, contendo carbono, tais como etanol e metano, para sua formação. Já o método *top-*

down, baseia-se na exfoliação das camadas de grafeno presentes no grafite ^{6,7}. O procedimento *top-down* é amplamente utilizado pois possui vantagens, tais como: rendimento superior, baixo custo e possibilidade de produção em larga escala ⁸.

Figura 2 - Métodos *bottom-up* e *top-down* para obtenção de grafeno.



Fonte: Chaitoglou, S. 2016 ⁹.

Dos métodos disponíveis para realizar o processo de exfoliação, pode-se destacar o procedimento de microclivagem mecânica, que promove a descamação do grafite através de uma fita adesiva favorecendo a deposição de um fino filme de grafeno sobre a superfície dessa fita ¹⁰. A exfoliação química é outro procedimento que, com o auxílio de agentes oxidantes, possibilita a expansão das estruturas interlamelares do grafite, que posteriormente serão separadas mecanicamente por moagem ou ultrassom ¹¹. A qualidade do material esfoliado está estritamente relacionada à pureza do grafite utilizado durante a síntese. Quanto maior a qualidade da matéria prima, menor serão as falhas na rede cristalina hexagonal de grafeno ¹².

Mesmo possuindo alta área específica e algumas propriedades físico-químicas superiores, como já mencionadas, se comparado a outros nanomateriais, o caráter hidrofóbico do grafeno dificulta sua aplicação em alguns segmentos na nanotecnologia. Uma forma de reverter esse problema está na modificação da superfície do grafeno. Desse modo seus derivados podem possuir características específicas variando de acordo com a finalidade de aplicação ¹³.

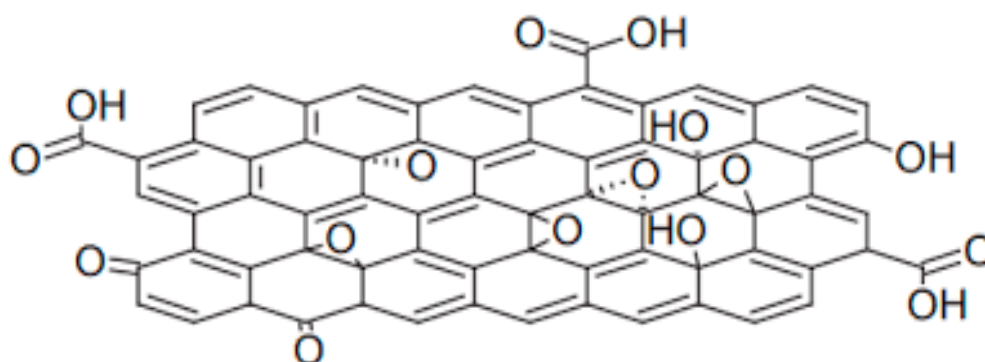
1.2 Óxido de grafeno

Para melhorar a interação com outros nanomateriais onde o grafeno apresenta baixa afinidade, o óxido de grafeno (OG) é empregado ¹⁴. Possuindo o mesmo

esqueleto carbonáceo que o grafeno, a principal diferença se dá nos grupos funcionais oxigenados presentes na superfície da estrutura do óxido de grafeno. Esses grupos, tais como, epoxila, carboxila, carbonila e hidroxila fornecem o caráter hidrofílico e facilitam a dispersão do material em água, aumentando também a distância interlamelar entre as folhas ^{15,16}.

A estrutura do óxido de grafeno ainda não é completamente elucidada, porém técnicas como a Nano-espectroscopia de Infravermelho, comprovam a disposição dos grupos funcionais oxigenados de forma desordenada ao longo das folhas ¹⁶. Diferentes modelos teóricos têm sido propostos para o óxido de grafeno, dentre eles os que mais se destacam são os modelos de Hofmann, Ruess, Scholz-Boehm, Nakajima-Matsuo, sendo o modelo proposto por Hofmann o mais difundido para exemplificações, como apresentado na Figura 3 ¹⁷.

Figura 3 - Estrutura da folha de óxido de grafeno com grupos funcionais epoxil, carboxil, carbonil e hidroxil utilizando o modelo teórico de Hofmann.



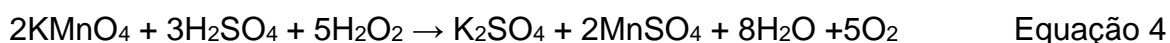
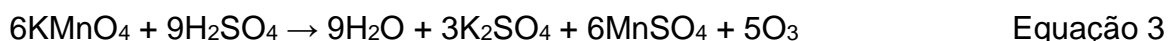
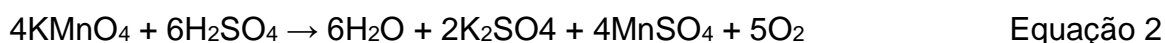
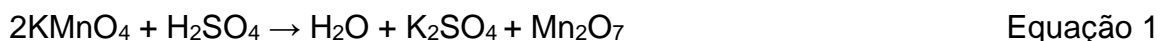
Fonte: Adaptado do modelo Hofmann¹⁷.

Dos métodos para obtenção de um composto gráfitico oxidado através de um agente oxidante forte, os mais antigos são os métodos Brodie (1859) e Staudenmaier (1898), ambos utilizando clorato de potássio (KClO₃) e ácido nítrico (HNO₃). Nessas rotas sintéticas havia a formação de um composto carbonáceo altamente oxidado, mas com a liberação de dióxido de cloro, um gás com alta toxicidade e inflamável em contato com o ar, fato que tornou essas rotas menos utilizadas ¹⁸.

Em 1958, surge a oxidação pelo método Hummers ¹⁹, que atualmente é a mais empregada, e consiste na oxidação do grafite a partir de uma mistura onde o agente oxidante é o permanganato de potássio (KMnO₄), juntamente com ácido sulfúrico e/ou nitrato de sódio (H₂SO₄, NaNO₃). É um procedimento suscetível a modificações de

acordo com o grau de oxidação desejado, evita a liberação de gases nocivos durante a síntese, podendo ser denominado como método de Hummers modificado ^{20,21}.

Nesse método de oxidação é possível citar as reações 1-5, que irão possibilitar a formação de moléculas de O₂, responsáveis pela oxidação da estrutura gráfrica ²²:



Ainda não é conhecido um método que faça a conversão de grafite à OG sem a formação de resíduos, portanto é necessário evitar qualquer tipo de contaminante provindo da síntese (ácidos, sais, etc.), assim como sendo necessária a remoção de grafite não reagido ²³. Técnicas de purificação, tais como, centrifugação e diálise, podem garantir uma total remoção dos resíduos presentes da síntese, mas em ambos métodos se tem um processo demorado, requerendo dias para completa remoção de impurezas ²⁴. Com a retirada do material espúrio, o óxido de grafeno pode então ser aplicado em diversos estudos, como apresentado na Tabela 1, a combinação dos filmes de óxido de grafeno com outros nanomateriais de interesse.

Tabela 1: Combinação de óxido de grafeno com outros materiais e suas aplicações.

Combinação	Aplicação	Referência
OG/Polímero (Polietilenoimina)	Supercapacitores	Yu, D., & Dai, L. 2009 ²⁵ .
OG/MnO₂	Supercapacitores	Chen, S. <i>et al</i> , 2010 ²⁶ .
OG/Peroxidases	Biosensor	Kauling, Alan P., et al, 2018 ²⁷ .
OG/Zn e OG/Sn	Bactericida	Panda, Sunita, et al. 2018 ²⁸
OG/Quitosana	Tratamento de resíduos	Sherlala, A. I. A., et al, 2018 ²⁹ .
GO/Fe₃O₄	Tratamento de resíduos	Koushkbaghi, Shahnaz, et al, 2016 ³⁰ .
GO/Fe₃O₄	Sensor	Dahaghin, Z., et al, 2018 ³¹ .
GO/Fe₃O₄	Agente de contraste	Zan, Ping, et al, 2016 ³² .

Fonte: Elaborado pelo autor.

1.3 Nanopartículas de óxido de ferro

O estudo de partículas em escala nanométrica vem sendo expandido em pesquisas científicas em razão da grande necessidade de novos materiais, com atributos superiores para diversas funções. Esses materiais podem possuir tamanho de 1 a 100 nm ³³, dispõem de propriedades únicas se comparados a materiais de mesma composição química em escala macroscópica, tais como propriedades elétricas, ópticas, químicas, sendo mais reativos e com características magnéticas bastante dependentes do tamanho ^{34,35}.

Em materiais magnéticos macroscópicos existe a presença de múltiplos domínios magnéticos, sendo cada um desses a soma dos momentos magnéticos de uma determinada região do material e responsáveis pela diminuição da energia desmagnetizante, ou magnetostática ³⁵. Cada domínio é separado por uma parede de domínio, tendo sua orientação progressivamente alterada até estar ordenada com o domínio seguinte, como mostrado na Figura 4.

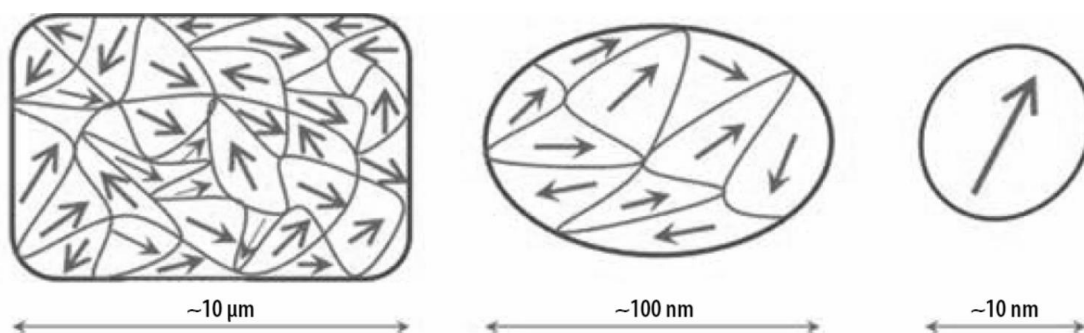
Figura 4 - Esquemática dos múltiplos domínios magnéticos e suas paredes.



Fonte: Callister, W.D., 2007 ³⁶.

Com a diminuição das dimensões do material magnético, a energia de superfície torna-se gradativamente mais elevada, assim como a energia de formação da parede de cada domínio. Nas condições de tamanho crítico (D_c), encontrado em nanopartículas magnéticas (NPM) menores que 20 nm, é energeticamente propício a remoção das paredes de domínio. Nesse limite, cada partícula assume a configuração de um único monodomínio, apresentado na Figura 5, tornando-se um pequeno ímã com propriedades superparamagnéticas ³⁷.

Figura 5 – Domínios magnéticos em função da dimensão do material.

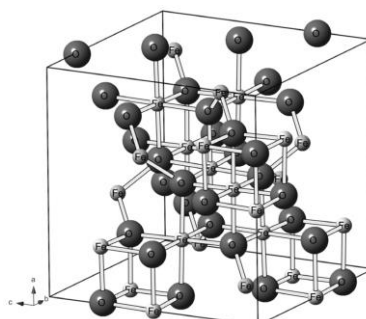


Fonte: Francisquine, E., 2014 ³⁵.

As NPM, devido a interação magnética com um campo magnético externo, podem ser empregadas em inúmeras áreas, tais como catálise, liberação controlada de moléculas bioativas, hipertermia, remoção de metais pesados e suporte enzimático ³⁸.

Sendo uma mistura de óxidos de ferros comuns (FeO e Fe_2O_3), a magnetita (Fe_3O_4) possui a estrutura cristalográfica cúbica de espinélio invertido, formados pelo empacotamento *cfc* (cúbico de face centrada) dos ânions bivalentes O^{2-} e os cátions metálicos Fe^{2+} e Fe^{3+} ocupando sítios intersticiais distintos ³⁹. Como mostrado na Figura 6, a magnetita é composta por 32 íons de oxigênio presentes nos vértices e tendo dispostos igualmente íons Fe^{3+} em sítios tetraédricos e octaédricos, alinhados antiparalelamente, anulando assim o momento magnético resultante desses íons. O comportamento magnético é proveniente dos íons Fe^{2+} que estão todos dispostos nos sítios octaédricos e alinhados na mesma direção ⁴⁰.

Figura 6 - Estrutura cristalina da magnetita.



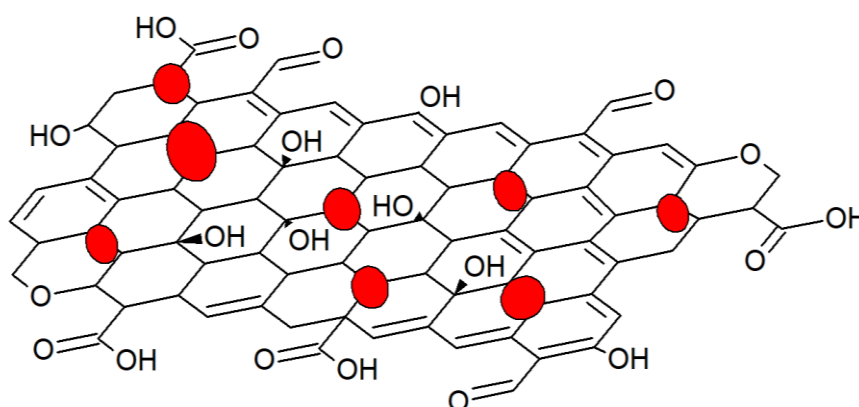
Fonte: Oliveira. L.C.A, *et al* (2013) ⁴⁰.

Magnetitas podem ser obtidas por microemulsões, síntese hidrotérmica, decomposição térmica e por coprecipitação ⁴¹. Entre esses métodos, o mais aplicado e simples é a rota sintética por coprecipitação, na qual reagem sais de ferro (Fe^{2+} e Fe^{3+})

em meio básico, permitindo a obtenção magnetita com baixo custo e conhecidas por sua fácil interação com a superfície de OG ⁴².

Com uma alta área de superfície específica e devido a presença dos grupos mencionados anteriormente, os filmes de OG permitem a modificação com nanopartículas magnéticas de magnetita. Esse procedimento pode ser feito de forma simples, com a utilização do método de coprecipitação de nanopartículas, referido anteriormente. Ao se realizar a funcionalização de folhas de OG com NPM de óxido de ferro há a formação de um óxido de grafeno magnético (OGM), que possui as características combinadas de ambos os materiais utilizados, como esquematizado na Figura 7 ^{43,44}.

Figura 7 - Estrutura de óxido de grafeno magnético (OGM) (núcleos de NPM em vermelho).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A dispersão das nanopartículas ao longo da estrutura de OG também evita a formação de agregados de NPM, que podem reduzir a área de superfície e diminuir a interação com outros materiais. A combinação de fatores tais como o aumento de estabilidade química das NPM e a fácil separação das folhas de OG, dado à influência de um campo magnético externo, tornam esse composto híbrido atrativo para inúmeras pesquisas, tais como em processos biomédicos, agente de contraste em ressonâncias magnéticas, eletrônicos e na indústrias de bioenergia ⁴⁵⁻⁴⁷.

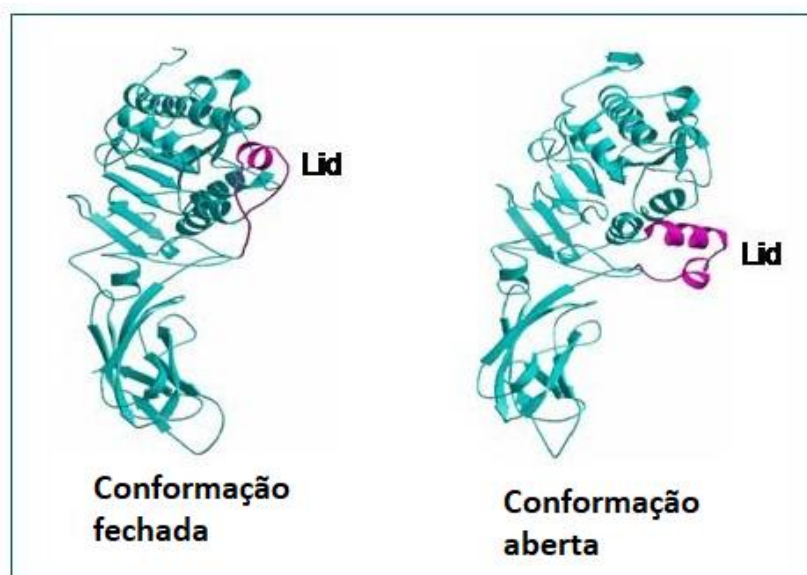
1.4 Lipases

Nanoestruturas de óxido de grafeno magnético podem ser empregadas como suportes para imobilização de enzima lipase ⁴⁸. Na busca por novas tecnologias que

auxiliem na produção de alimentos, produtos de limpeza e combustíveis provindos de fontes renováveis, as pesquisas são crescentes quando relacionadas à enzima lipase (E.C.3.1.1.3 *triacilglicerol-acil-hidrolase*), pertencentes ao grupo das hidrolases ^{49,50}. As lípases podem ser encontradas em plantas, animais e em microrganismos (sendo os principais leveduras e fungos filamentosos). Dentre as principais fontes de lipases destacam-se: lipase pancreática bovina, lipase humana, lipase equina e lipases de origem fúngica como *Humicola lanuginosa*, *Rhizopus delemar*, *Pseudomonas glumae*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica* ⁵⁰.

As lipases apresentam um padrão conformacional comum, definido como α/β de hidrolase, onde está situada a tríade catalítica (Ser-His-Asp/Glu) ⁵¹. Sua capacidade de catálise ocorrerá com uma ativação interfacial (óleo/água), em virtude da presença de um oligopéptido hidrofóbico em sua estrutura, denominado *lid* ou *flap*, Figura 8. O *lid*, um componente também característico das lipases, quando em contato com uma fase hidrofóbica, solvente orgânico ou uma simples gota lipídica expõe o sítio ativo da lipase, possibilitando então a entrada de substrato, dando a conformação “aberta” para a enzima ⁵².

Figura 8 – Conformações da enzima lipase.

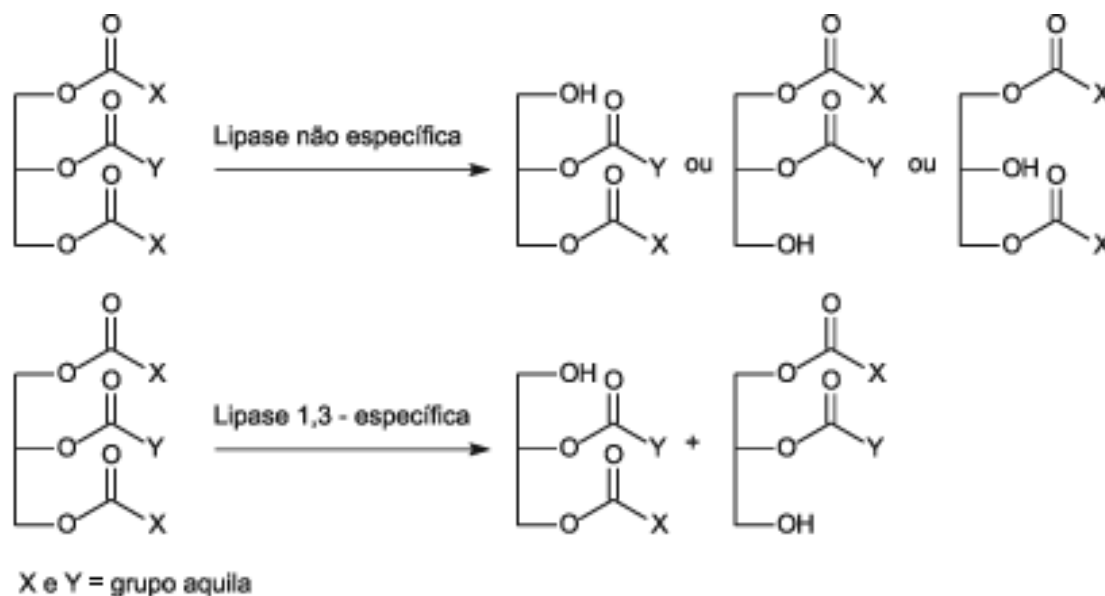


Fonte: Palomo J.M., *et al*, 2003 ⁵³.

O interesse industrial para essas enzimas se dá pela capacidade de catalisarem a hidrólise total ou parcial de acil ésteres de cadeia longa, sendo o triacilglicerol o substrato mais utilizado para a formação de diacilgliceróis (DAG), monoacilgliceróis

(MAG), glicerol e ácidos graxos livres ⁵⁴. A figura 9 apresenta um esquema de classificação de lipases de acordo com sua regioesletividade, sendo subdivididas em: (A) lipases 1,3-específicas - hidrolisam os ésteres presentes no triacilglicerol na posição 1 ou 3 e (B) lipases não-específicas - hidrolisam os ésteres presentes no triacilglicerol em qualquer posição ⁵⁵.

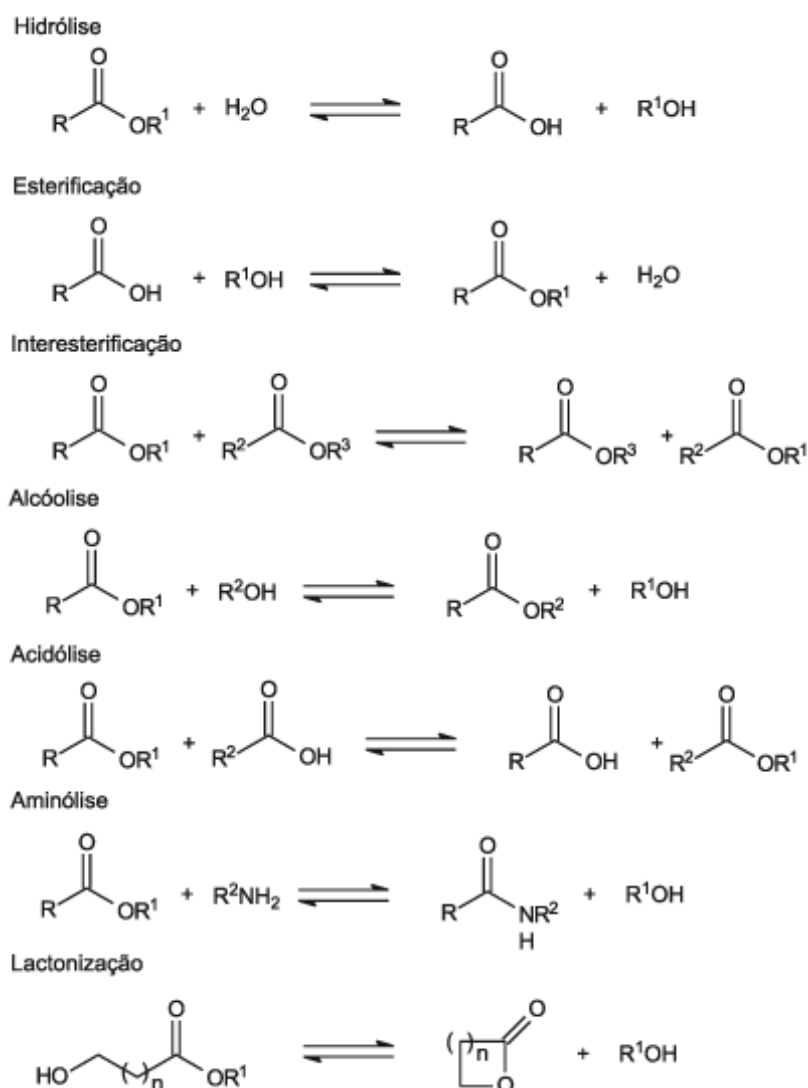
Figura 9 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica



Fonte: Paques, F.W., Macedo, G.A., 2006 ⁵⁶

Das principais aplicações é possível citar a utilização de lipases para: tratamento de resíduos oleosos, cosméticos, fabricação de antibióticos, preparo de detergentes e surfactantes e mais recentemente na produção de biodiesel ^{57,58}. O emprego de lipases também possibilita catalisar reações reversas, dependendo da disponibilidade de água presente no meio reacional. Na Figura 10 são apresentadas as principais reações que as lipases podem favorecer e encontradas na Tabela 2 estão as aplicações industriais para essas reações.

Figura 10 – Reações catalisadas por lipases.



Fonte: Paques, F.W., Macedo, G.A., 2006 ⁵⁸.

Tabela 2: Reações catalisadas por lipases e suas principais aplicações

Reações	Principais aplicações	Referências
Hidrólise	Aditivos para detergentes	Navvabi, A., et al, 2018 ⁵⁹ .
Esterificação	Produção de ésteres específicos	Aguieiras, E. C. et al, 2019 ⁶⁰ .
Interesterificação	Modificação de gorduras	Falção, A. O. 2015 ⁶¹ .
Alcóólise	Produção de ésteres específicos	Reinehr, C. O., et al, 2014 ⁶² .
Acidólise	Produção de lipídios estruturados	Sarmah, Nipon, et al, 2018 ⁶³ .
Aminólise	Produção de amidas específicas	Zeng, S. et al, 2018 ⁶⁴ .
Lactonização	Esterificação intramolecular	Messias, et al, 2011 ⁶⁵ .

Fonte: Elaborado pelo autor.

O aumento do rendimento, condições reacionais mais amenas, assim como impedimento de reações secundárias indesejáveis ao longo do processo são vantagens encontradas em processos catalisados por enzimas lipases 1-3 específicas ou não-específicas ⁶⁶. Procedimentos que empregam catalisadores químicos na produção de biodiesel ou de produtos farmacêuticos, necessitam de temperaturas e pressões elevadas para possibilitar a formação do produto principal, podendo ter sua pureza diminuída em consequência da presença de subprodutos indesejados.

Embora seja encontrada em quase todos os seres vivos, a obtenção de lipase é limitada, na medida que a principal fonte de lipase em escala industrial são microrganismos, devido à necessidade de baixo custo para isolamento, comparada com o de outros organismos. Entretanto a extração de lipase tem baixo rendimento, sendo também de difícil purificação, o que compromete a estabilidade e a atividade enzimática ⁵⁷.

Para melhorar a estabilidade de um material que será aplicado como biocatalisador, a utilização de materiais para suporte tais como polímeros orgânicos, sílica e outros óxidos de metais, através de inúmeros métodos de imobilização enzimática, vem sendo objeto de pesquisa ⁶⁷. Tendo em vista uma estratégia para diminuir custos e aumentar a estabilidade operacional em procedimentos que envolvem lipases, a aplicação de um suporte como o óxido de grafeno magnético é vantajosa. Sua alta área superficial, o fácil preparo e suas propriedades magnéticas, possibilitam a recuperação do biocatalisador de interesse que poderá ser empregado de inúmeras formas ^{68,69}.

1.5 Processo de imobilização

A fim de se viabilizar a interação suporte/enzima, a escolha do melhor processo de imobilização possibilita propriedades como: boa atividade enzimática, alta estabilidade térmica e de estocagem, alta quantidade de enzima suportada e reutilização ⁷⁰. Entre as formas de imobilizar enzimas estão os métodos físicos e químicos ilustrados no esquema apresentado na Figura 11 ^{71,72}.

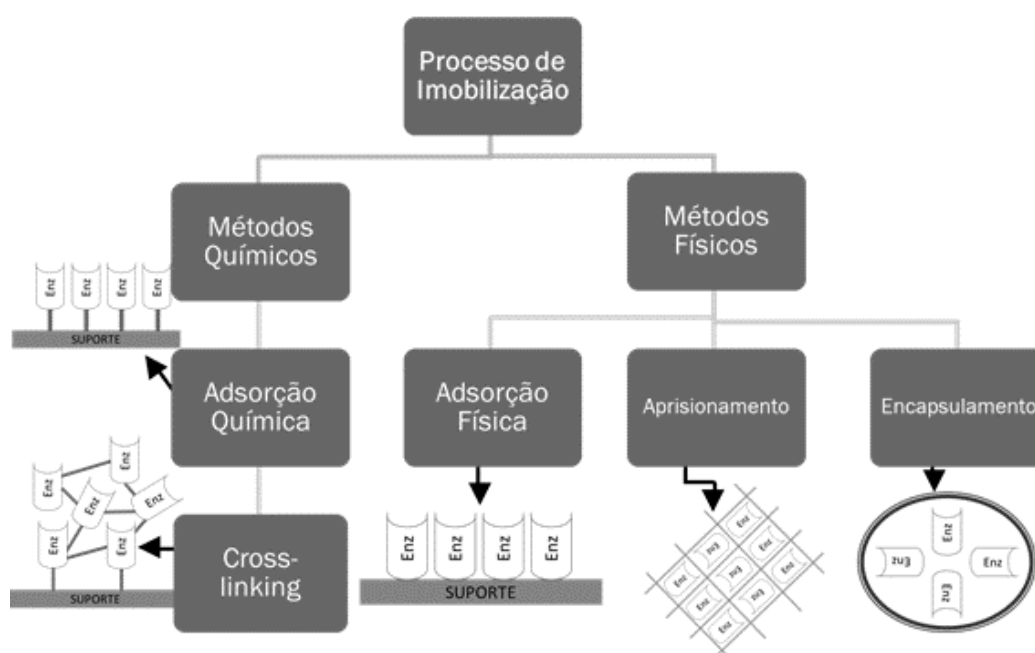
A adsorção física é o método mais comum encontrado para imobilização enzimática, nesse processo as enzimas são adsorvidas na superfície do suporte sem nenhum tratamento adicional. Este procedimento ocorre através de interações eletrostáticas entre o suporte e a enzima, e geralmente possibilita uma alta atividade

enzimática no ciclo inicial. É uma técnica simples e pode ser usada em larga escala, mas por outro lado, a atividade diminui de forma drástica com o tempo, pois a mesma é perdida para meio, devido as fracas interações ⁷³.

O aprisionamento e o encapsulamento são outros métodos físicos importantes que podem ser usados para a imobilização. Enzimas imobilizadas por aprisionamento ficam “presas” em um espaço limitado dentro de uma matriz polimérica e esse microambiente pode melhorar a estabilidade enzimática ⁷⁴. A desvantagem deste processo é que substratos com alto peso molecular não podem acessar a enzima aprisionada devido ao impedimento causado pela matriz ⁷⁵. O encapsulamento também é um método para aprisionar enzimas, mas, neste caso, a captura enzimática será dentro de um invólucro ou membrana semipermeável, como os hidrogéis, possibilitando uma alta carga de enzimas e uma grande estabilidade operacional, porém os riscos de ruptura são altos se não houver difusão dos produtos formados ⁷⁶.

Utilizando o procedimento químico (método covalente ou adsorção química), através de um agente de ativação (ou *crosslinker*) é possível promover uma ligação entre suporte/enzima mais estável, evitando a perda da enzima imobilizada ao longo do processo de reciclo. Os agentes de ligações cruzadas mais comuns são homobifuncionais, possuindo dois grupos funcionais terminais reativos e semelhantes, como duas aminas, dois tióis ou dois aldeídos que interagirão em alvos idênticos ^{77,78}.

Figura 11 – Métodos de imobilização de enzimas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para que o suporte adquira a mesma afinidade química que as enzimas, sendo os grupos funcionais amino os principais responsáveis pela interação com o agente de ativação, sua funcionalização com compostos aminosilanos é recomendada. O principal agente de ativação empregado em processos de imobilização por ligações covalente é o glutaraldeído (GA), em razão da fácil interação com os grupos amino presentes nas enzimas e suporte funcionalizado, o baixo custo e seu simples manuseio ^{79,80}.

Visando então um processo que seja não somente eficiente, mas também sustentável, a utilização de lipases imobilizadas por ligação covalente é proposta para contornar essas desvantagens. Uma investigação que relacione as etapas de obtenção do suporte magnético utilizado para imobilização de enzimas é fundamental para incorporação de novos processos que facilitem a produção de materiais com alto valor agregado.

5. CONCLUSÕES

Óxido de grafeno foi sintetizado através do método de Hummer modificado garantindo que grande parte do precursor grafite fosse oxidado. A esfoliação das folhas sucedeu-se empregando ultrassom sobre a amostra em solução, enquanto que a purificação foi realizada ao longo de inúmeras filtrações e o OG foi obtido com êxito. Técnicas como Infravermelho e TG confirmaram a existência dos grupos funcionais oxigenados na estrutura das folhas de OG.

Por meio do processo de coprecipitação foram decoradas as folhas de óxido de grafeno com nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Fe_3O_4), que deram o caráter magnético na amostra, sendo a magnetita a fase cristalina dessas nanopartículas e comprovada através de análises como DRX. Utilizando microscopias eletrônica de varredura com imagens referentes as folhas de óxido de grafeno antes e depois do processo de coprecipitação a presença de núcleos magnéticos de NP foi constatada. Com o emprego de um campo magnético externo as propriedades magnéticas do suporte com óxido de ferro também foram ratificadas

As características da estrutura carbonácea (bandas D e G) foram mantidas ao longo de todas as etapas propostas, como oxidação e exfoliação, adição de nanopartículas, funcionalização com APTES e imobilização de diferentes lipases, como mostrado na espectroscopia Raman.

Testes hidrolíticos das diferentes lipases (LPP, LCR e LAN) imobilizadas no suporte magnético sintetizado através de ligações covalente, indicaram as condições ótimas de temperatura e pH para a atividade catalítica de cada lipase estudada, sendo estas 37°C e pH 8 para a LPP, 50°C e pH 6 para a LCR e 40°C e pH 9 para a LAN. O comportamento enzimático das enzimas suportadas foi satisfatório, sendo apresentado assim a vantagem para utilização do biocatalisador em meios alcalinos, devido a proteção garantida pelo suporte magnético.

Os ensaios de reuso das LPPs confirmaram a facilidade de recuperação através da utilização do campo magnético externo, torna-as também recicláveis. Dessa forma, a utilização de lipase em óxido de grafeno magnético é promissora para o desenvolvimento sustentável de novas técnicas que podem ser empregadas nos setores alimentícios, farmacêuticos e na indústria química.

REFERÊNCIAS

1. Akinwande, D. *et al.* A review on mechanics and mechanical properties of 2D materials—Graphene and beyond. ***Extreme Mechanics Letters***, v. 13, p.42–77, 2017.
2. Ramirez, S. *et al.* Thermal and magnetic properties of nanostructured densified ferrimagnetic composites with graphene - graphite fillers. ***Materials and Design***, v.118, p.75–80, 2017.
3. Ishani, M., Dekamin, M. G. & Alirezvani, Z. Superparamagnetic silica core-shell hybrid attached to graphene oxide as a promising recoverable catalyst for expeditious synthesis of TMS-protected cyanohydrins. ***Journal of Colloid and Interface Science***, v.521, p. 232–241, 2018.
4. Wong, C. H. A., Chua, C. K., Khezri, B., Webster, R. D. & Pumera, M. Graphene oxide nanoribbons from the oxidative opening of carbon nanotubes retain electrochemically active metallic impurities. ***Angewandte Chemie - International Edition***, v. 52, p. 8685–8688, 2013.
5. Zhang, Y., Chen, Q., Jin, Z. & Sun, H. Biomimetic graphene films and their properties. ***Nanoscale***, p.4858–4869, 2012. doi:10.1039/c2nr30813d
6. Buzaglo, M. *et al.* Graphite-to-Graphene: Total Conversion. ***Advanced Materials***, v.29, p.1–5, 2017.
7. Souza, V. H. R., Oliveira, M. M. & Zarbin, A. J. G. Bottom-up synthesis of graphene/polyaniline nanocomposites for flexible and transparent energy storage devices. ***Journal of Power Sources***, v. 348, p.87–93,2017.
8. Shi, P. C. *et al.* Large-scale production of high-quality graphene sheets by a non-electrified electrochemical exfoliation method. ***Carbon***, v. 126, p.507–513, 2018.
9. Chaitoglou, S. **Growth Study and Characterization of Single Layer Graphene Structures Deposited on Copper Substrate by Chemical Vapor Deposition Growth**

Study and Characterization of Single Layer Graphene Structures Deposited on Copper Substrate by Chemical Vapor Deposition. Universidade de Barcelona, 2016.

10. Di, J., Xia, J., Li, H. & Liu, Z. Freestanding atomically-thin two-dimensional materials beyond graphene meeting photocatalysis: Opportunities and challenges. ***Nano Energy***, v.35, p. 79–91, 2017.
11. Dong, L., Yang, J., Chhowalla, M. & Loh, K. P. **Royal Society of Chemistry**, v. 46, p. 7306–7316, 2017.
12. Stankovich, S. *et al.* Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. ***Carbon***, v.45, p. 1558–1565, 2007.
13. Romero, U. A. M., Soto, M. Á. V., Jiménez, L. L., Quintana, J. Á. & García, S. A. P. Graphene Derivatives: Controlled Properties, **Nanocomposites, and Energy Harvesting Applications**, 2017.
14. Belay, M., Nagarale, R. K. & Verma, V. Preparation and characterization of graphene-agar and graphene oxide-agar composites. ***Journal of Applied Polymer Science***, v.134, p.1–12 2017.
15. Huang, X. *et al.* Graphene Oxide Dielectric Permittivity at GHz and Its Applications for Wireless Humidity Sensing. ***Scientific Reports***, v. 8, p.1–7, 2018.
16. Liu, Z. *et al.* Direct observation of oxygen configuration on individual graphene oxide sheets. ***Carbon***, v. 127, p. 141–148, 2018.
17. Rahim Shah, Ayesha Kausara, B. M. & S. S. Progression from Graphene and Graphene Oxide to High Performance Polymer-Based Nanocomposite: A Review. ***Polymer-Plastic Technology and Engineering***, 2015.
18. Pendolino, F. & Armata, N. in *Graphene Oxide in Environmental Remediation Process*, 2017.

19. WILLIAM S. HUMMERS, JR., A. R. E. O. Preparation of Graphitic Oxide. **Baroid Division, National lead company**. v.208 p. 1937, 1957.
20. Yuan, R. *et al.* Graphene oxide-monohydrated manganese phosphate composites: Preparation via modified Hummers method. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v.547, p.56–63, 2018.
21. Zhu, B. Y. *et al.* Graphene and Graphene Oxide : Synthesis , Properties , and Applications. *Advanced Materials*, p. 3906–3924, 2010.
22. Filho, J. C. R. **PRODUÇÃO DE ÓXIDO DE GRAFENO VIA MICRO-ONDAS**. Instituto de Química UFMS, 2016.
23. Eigler, S. & Hirsch, A. Chemistry with graphene and graphene oxide - Challenges for synthetic chemists. *Angewandte Chemie - International Edition*, v.53, p. 7720–7738, 2014.
24. Chen, J., Li, Y., Huang, L., Li, C. & Shi, G. High-yield preparation of graphene oxide from small graphite flakes via an improved Hummers method with a simple purification process. *Carbon*, v.81, p.826–834, 2015.
25. Yu, D., & Dai, L. Self-assembled graphene/carbon nanotube hybrid films for supercapacitors. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, v.1, p.467-470., 2009.
26. Chen, S., Zhu, J., Wu, X., Han, Q., & Wang, X. Graphene oxide– MnO₂ nanocomposites for supercapacitors. *ACS nano*, v.4, p.2822-2830, 2010.
27. Kauling, Alan P., *et al.* The Worldwide graphene flake production. **Advanced Materials**, p.30.44, 2018.
28. Panda, Sunita, *et al.* Electron transfer directed antibacterial properties of graphene oxide on metals. **Advanced Materials**, p.30- 37. 2018.
29. Sherlala, A. I. A., *et al.* A review of the applications of organo-functionalized

magnetic graphene oxide nanocomposites for heavy metal adsorption. **Chemosphere**, v.193, p.1004-1017, 2018.

30. Koushkbaghi, Shahnaz, *et al.* Fabrication of PET/PAN/GO/Fe₃O₄ nanofibrous membrane for the removal of Pb (II) and Cr (VI) ions. **Chemical Engineering Journal**, v. 301, p.42-50, 2016.

31. Dahaghin, Z., Kilmartin, P. A., & Mousavi, H. Z. Simultaneous determination of lead (II) and cadmium (II) at a glassy carbon electrode modified with GO@ Fe₃O₄@ benzothiazole-2-carboxaldehyde using square wave anodic stripping voltammetry. **Journal of Molecular Liquids**, v.249, p.1125-1132, 2018.

32. Zan, Ping, *et al.* One-pot fabricating Fe₃O₄/graphene nanocomposite with excellent biocompatibility and non-toxicity as a negative MR contrast agent. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.145, p. 208-216, 2016.

33. Kreuter J. Nanoparticles-a historical perspective. **International Journal of Pharmaceutics**, v331, p. 1-10, 2007.

34. Shokrollahi, H. A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of maghemite. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v.426, p. 74–81, 2017.

35. Francisquini, E., Schoenmaker, J. & Souza, J. A. Nanopartículas Magnéticas e suas Aplicações. **Química Supramolecular e Nanotecnologia**, p.269–288, 2014.

36. Callister, W. D. **Materials Science and Engineering**, 2007.

37. Majetich, S. A. & Jin, Y. Magnetization directions of individual nanoparticles. **Science**, v. 284, p. 470–473, 1999.

38. Zamora-Mora, V. *et al.* Chitosan nanoparticles for combined drug delivery and magnetic hyperthermia: From preparation to in vitro studies. **Carbohydrate Polymers**, v.157, p. 361–370, 2017.

39. Szotek, Z. *et al.* Electronic structures of normal and inverse spinel ferrites from first principles. *Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics*, v. 74, p.1–12, 2006.
40. Oliveira, L. C. A., Fabris, J. D. & Pereira, M. C. **Óxidos De Ferro E Suas Aplicações Em Processos Catalíticos: Uma Revisão.** v.36, p.123–130, 2013.
41. Su, C. Environmental implications and applications of engineered nanoscale magnetite and its hybrid nanocomposites: A review of recent literature. *Journal of Hazardous Materials*, v.322, p. 48–84, 2017.
42. Bashtani, E., Amiri, A. & Baghayeri, M. A nanocomposite consisting of poly(methyl methacrylate), graphene oxide and Fe₃O₄ nanoparticles as a sorbent for magnetic solid-phase extraction of aromatic amines. *Microchimica Acta*, v. 185, 2018.
43. Shen, J. *et al.* One Step Synthesis of Graphene Oxide - Magnetic Nanoparticle Composite. *Journal Physical Chemistry*, v. 114, p.1498–1503, 2010.
44. Sun, J., Liang, Q., Han, Q., Zhang, X. & Ding, M. One-step synthesis of magnetic graphene oxide nanocomposite and its application in magnetic solid phase extraction of heavy metal ions from biological samples. *Talanta*, 2014.
45. Mahpishanian, S. & Sereshti, H. Three-dimensional graphene aerogel-supported iron oxide nanoparticles as an efficient adsorbent for magnetic solid phase extraction of organophosphorus pesticide residues in fruit juices followed by gas chromatographic determination. *Journal of Chromatography A*, v.1443, p. 43–53, 2016.
46. Sharma, V. K., McDonald, T. J., Kim, H. & Garg, V. K. Magnetic graphene-carbon nanotube iron nanocomposites as adsorbents and antibacterial agents for water purification. *Advances in Colloid and Interface Scienc*, v. 225, p. 229–240, 2015.
47. PAIVA, J. M. DE. **Nanoestruturas de óxido de grafeno magnético : modificação e funcionalização de superfície para terapia fotodinâmica e fototérmica.** Dissertação apresentada ao Instituto de Universidade Estadual Paulista,

Instituto de Química - UNESP ARARAQUARA, 2017.

48. Li, X. *et al.* One-pot polyol synthesis of graphene decorated with size- and density-tunable Fe₃O₄ nanoparticles for porcine pancreatic lipase immobilization. **Carbon**, v. 60, p. 488–497, 2013.
49. Goswami, V. K. & Sharma, J. G. An Intermediate Temperature Stable , Extracellular and Alkaline Lipase from *Pseudomonas aeruginosa* and Its Application in Biodiesel Production. **Asian Journal of Applied Science and Technology**, v. 1, p. 104–115, 2017.
50. Maldonado, R. R. A Review on Geotrichum Lipases: Production, Purification, Immobilization and Applications. **Chemical and Biochemical Engineering Quarterly Journal**, v. 30, p. 439–454, 2017.
51. Costa, V. E. U. & De Amorim, H. L. N. O emprego de lipases como agentes de resolução cinética de enantiômeros em síntese orgânica: Aspectos gerais sobre a influência do solvente. **Quimica Nova**, v. 22, p.863–873, 1999.
52. Schmid, R. D. & Verger, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 37, p.1608–1633, 1998.
53. Palomo, J. M. *et al.* General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v.4, p.1–6, 2003.
54. Zhao, X., Qi, F., Yuan, C., Du, W. & Liu, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 44, p.182–197, 2015.
55. Xu, X. Production of specific-structured triacylglycerols by lipase-catalyzed reactions: a review. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 102, p. 287–303, 2000.

56. Paques, F. W. & Macedo, G. A. Lipases de latex vegetais: Propriedades e aplicações industriais. **Química Nova**, v. 29, p.93–99, 2006.
57. Hama, S., Noda, H. & Kondo, A. How lipase technology contributes to evolution of biodiesel production using multiple feedstocks. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 50, p. 57–64, 2018.
58. Seitz, E. W. Industrial application of microbial lipases: A review. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 51, p.12–16, 1974.
59. Navvabi, A., Razzaghi, M., Fernandes, P., Karami, L., & Homaei, A. Novel lipases discovery specifically from marine organisms for industrial production and practical applications. **Process biochemistry**, 2018.
60. Aguiéiras, E. C., de Barros, D. S., Fernandez-Lafuente, R., & Freire, D. M. Production of lipases in cottonseed meal and application of the fermented solid as biocatalyst in esterification and transesterification reactions. **Renewable energy**, v.130, p.574-581, 2019.
61. Falcão, A. O. **Influência da interesterificação enzimática nas propriedades biológicas de óleos da Amazônia**. Dissertação apresentada na UNICAMP, Programa de Pós-Graduação: Alimentos e Nutrição 2015.
62. Reinehr, C. O., Rizzardi, J., Silva, M. F., Oliveira, D. D., Treichel, H., & Colla, L. M. Production of lipases with *Aspergillus niger* and *Aspergillus fumigatus* through solid state fermentation. **Química Nova**, v.37, p.454-460, 2014.
63. Sarmah, Nipon, *et al.* Recent advances on sources and industrial applications of lipases. **Biotechnology progress**, v. 34, p. 5-28, 2018.
64. Zeng, S., *et al.* Amide Synthesis via Aminolysis of Ester or Acid with an Intracellular Lipase. **ACS Catalysis**, v.8, p. 8856-8865, 2018.
65. Messias, J. M., da Costa, B. Z., de Lima, V. M. G., Giese, E. C., Dekker, R. F. H.,

& de Melo Barbosa, A. Microbial lipases: Production, properties and biotechnological applications. **Semina: Exact and Technological Sciences**, v. 32, p. 213-234, 2011.

66. Pourzolfaghar, H., Abnisa, F., Mohd, W. & Wan, A. A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 61, p.245–257, 2016.

67. Cipolatti, E. P., Manoel, E. A., Fernandez-Lafuente, R. & Freire, D. M. G. Support engineering: relation between development of new supports for immobilization of lipases and their applications. **Biotechnology Research and Innovation**, v. 1, p. 26–34, 2017.

68. Zhang, G. *et al.* Lipase immobilized on graphene oxide as reusable biocatalyst. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 53, p. 19878–19883, 2014.

69. Li, X. *et al.* Papain/Zn₃(PO₄)₂ hybrid nanoflower: preparation, characterization and its enhanced catalytic activity as an immobilized enzyme. **RSC Adv.**, v. 6, p. 46702–46710, 2016.

70. Bilal, M. *et al.* Immobilized ligninolytic enzymes: An innovative and environmental responsive technology to tackle dye-based industrial pollutants – A review. **Science of the Total Environment**, v. 576, p. 646–659, 2017.

71. Smith, S. K. *et al.* Quantitative Comparison of Enzyme Immobilization Strategies for Glucose Biosensing in Real-Time Using Fast-Scan Cyclic Voltammetry Coupled with Carbon-Fiber Microelectrodes. **ChemPhysChem**, p.1–9, 2018.

72. De Melo, R. R. *et al.* New heterofunctional supports based on glutaraldehyde-activation: A tool for enzyme immobilization at neutral pH. **Molecules**, v. 22, 2017.

73. Márquez, A. *et al.* Enzyme adsorption-induced activity changes: a quantitative study on TiO₂ model agglomerates. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, p. 55, 2017.

74. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. An

overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. ***Biotechnology and Biotechnological Equipment***, v. 29, p. 205–220, 2015.

75. Karav, S. , Cohen, J. L., Barile, D. and de Moura Bell, J. M. Recent advances in immobilization strategies for glycosidases. ***Biotechnol Progress***, p. 104–112, 2017.

76. Cao, L. in *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*, **John Wiley & Sons**. p. 397–438, 2005.

77. Lakra, R., Kiran, M. S. & Sai, K. P. Fabrication of homobifunctional crosslinker stabilized collagen for biomedical application. ***Biomedical Materials (Bristol)*** 10, 2015.

78. Liu, M. Q., Dai, X. J., Guan, R. F. & Xu, X. Immobilization of *Aspergillus niger* xylanase A on Fe₃O₄-coated chitosan magnetic nanoparticles for xylooligosaccharide preparation. ***Catalysis Communications***, v. 55, p. 6–10, 2014.

79. Zhang, D., Hegab, H. E., Lvov, Y., Dale Snow, L. & Palmer, J. Immobilization of cellulase on a silica gel substrate modified using a 3-APTES self-assembled monolayer. ***SpringerPlus***, v. 5, 2016.

80. Sánchez-Ramírez, J. *et al.* Cellulases immobilization on chitosan-coated magnetic nanoparticles: application for *Agave Atrovirens* lignocellulosic biomass hydrolysis. ***Bioprocess and Biosystems Engineering***, v. 40, p. 9–22, 2017.

81. Paula, A. V. de. **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada : otimização das condições reacionais e operacionais**. Tese de doutorado, USP de Lorena, 2011.

82. Li, J., Zeng, X., Ren, T. & van der Heide, E. The Preparation of Graphene Oxide and Its Derivatives and Their Application in Bio-Tribological Systems. ***Lubricants***, v. 2, p.137–161, 2014.

83. Ciszewski, M. & Mianowski, A. Capacitive behavior of highly-oxidized graphite.

Materials Science- Poland, v. 32, p.307–314, 2014.

84. Rourke, J. P. *et al.* The real graphene oxide revealed: Stripping the oxidative debris from the graphene-like sheets. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, p.3173–3177, 2011.

85. Yang, H. *et al.* Covalent functionalization of chemically converted graphene sheets via silane and its reinforcement. **Journal of Materials Chemistry**, v. 19, p.4632–4638, 2009.

86. Kumar, K. S., Pittala, S., Sanyadanam, S. & Paik, P. A new single/few-layered graphene oxide with a high dielectric constant of 10^6 : Contribution of defects and functional groups. **RSC Advances**, v. 5, p.14768–14779, 2015.

87. Bao, C. *et al.* In situ preparation of functionalized graphene oxide/epoxy nanocomposites with effective reinforcements. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 13290–13298, 2011.

88. Balestrin, P. **Avaliação de métodos de decomposição de grafite flexível para determinação de elementos traço por ICP OES**. Dissertação Universidade Federal de Santa Maria, 2014.

89. Mohammadi, A., Peighambaroust, S. J., Entezami, A. A. & Arsalani, N. High performance of covalently grafted poly(o-methoxyaniline) nanocomposite in the presence of amine-functionalized graphene oxide sheets (POMA/f-GO) for supercapacitor applications. **Journal of Materials Science: Materials in Electronics**, v. 28, p. 5776–5787, 2017.

90. Marcano, D. C. *et al.* Improved synthesis of graphene oxide. **ACS nano**, v. 4, p. 4806-4814, 2010..

91. Zou, F. *et al.* Wrinkled surface-mediated antibacterial activity of graphene oxide nanosheets. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 9, p. 1343–1351, 2017.

92. Gomez-Navarro, C. Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets. *Nano Lett.* , v. 7, p. 3499–3503, 2007.
93. Ossoonon, B. D. & Bélanger, D. Synthesis and characterization of sulfophenyl-functionalized reduced graphene oxide sheets. *RSC Advances*, v. 7, p. 27224–27234, 2017.
94. Sureshkumar, M. & Lee, C. K. Polydopamine coated magnetic-chitin (MCT) particles as a new matrix for enzyme immobilization. *Carbohydrate Polymers*, v. 84, p. 775–780, 2011.
95. Shao, Y., Jing, T., Tian, J. & Zheng, Y. Graphene oxide-based Fe₃O₄ nanoparticles as a novel scaffold for the immobilization of porcine pancreatic lipase. *RSC Adv.*, v. 5, p.103943–103955, 2015.
96. Simone, G. & Michel, S. Effect of Taurodeoxycholate, Colipase and Temperature on the Interfacial Inactivation of Porcine Pancreatic Lipase. *European Journal of Biochemistry*, v. 111, p.117–124, 1980.
97. Jafarian, F., Bordbar, A. K., Zare, A. & Khosropour, A. The performance of immobilized *Candida rugosa* lipase on various surface modified graphene oxide nanosheets. *International Journal of Biological Macromolecules*, v.111, p. 1166–1174, 2018.
98. El-Batal, A., Farrag, A., Elsayed, M. & El-Khawaga, A. Biodiesel Production by *Aspergillus niger* Lipase Immobilized on Barium Ferrite Magnetic Nanoparticles. *Bioengineering*, v. 3, p. 14, 2016.
99. Pera, L. M., Romero, C. M., Baigori, M. D. & Castro, G. R. Catalytic properties of lipase extracts from *Aspergillus niger*. *Food Technology and Biotechnology*, v. 44, p. 247–252, 2006.