

CAROLINE OLIVEIRA DA ROCHA

Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de lipases

Dissertação apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques

Araraquara
2016

FICHA CATALOGRÁFICA

R672n Rocha, Caroline Oliveira da
 Nanopartículas magnéticas como suporte para
 imobilização de lipases / Caroline Oliveira da Rocha –
 Araraquara : [s.n], 2016
 57 f. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Instituto de Química
Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

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

Elaboração: Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

DADOS CURRICULARES

Endereço profissional: Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Instituto de Química de Araraquara, Departamento de Físico-Química Rua Professor Francisco Degni, nº 55, Quitandinha, Araraquara, 14800-900, SP – Brasil.
Telefone: (16) 3301-7636 E-mail: carolnine@iq.unesp.br

Formação acadêmica/titulação

2014 – 2016: Mestranda em Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de biocatalisadores.

Orientador: Rodrigo Fernando Costa Marques

Bolsista da: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.

2009 – 2013: Graduação em Bacharelado em Química. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, São Paulo, Brasil.

Título: Desenvolvimento de método analítico para determinação de nitrito em alimentos curados e vegetais por espectrofotometria UV-VIS e Tratamento digital de imagens.

Orientador: Arnaldo Alves Cardoso

Formação complementar

2014: Intercâmbio em parceria com a ABIPE. Desenvolvimento de método cromatográfico de íons para biomarcadores de solo. Universidade Martin Luther Halle-Wittenberg, Halle Saale, Alemanha.

Trabalhos apresentados na forma de pôster

1. ROCHA, C. O.; JAFELICCI Jr., M.; MILAGRE, C. D. F.; PAULA, A. V.; MARQUES, R. F. C. Magnetic Nanoparticles as support for biocatalyst. In: **Workshop a building a task force on materials of life**, 2015, Araraquara, SP.
2. ROCHA, C. O.; PETRUCI, J. F.; CARDOSO, A. A. Desenvolvimento e otimização de método analítico para determinação de alimentos curados por espectrofotometria UV-vis. **XXII Congresso de iniciação científica da Unesp**, 2010, Araraquara, SP.

CAROLINE OLIVEIRA DA ROCHA

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

Araraquara, 14 de março de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Fernando Costa Marques (Orientador)
Instituto de Química / UNESP / Araraquara - SP

Prof. Dr. Aniela Veloso de Paula
Faculdade de Ciências Farmacêuticas / UNESP / Araraquara - SP

Dr. Maria Gabriela Nogueira Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia / UNIFAL / Alfenas - MG

Dedico este trabalho aos meus pais Sebastião e Maria Edna pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Glauber pelo apoio e exemplo.

Ao meu namorado José Antônio por estar ao meu lado em todos os momentos, por me incentivar em momentos difíceis e comemorar em momentos de alegria.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Jataí/Jata pelo grande incentivo, confiança, amizade, pela positividade e alegria contagiante ao ensinar e orientar, o que me motivou a continuar nessa área maravilhosa da química.

Ao grupo do laboratório, em especial ao Pelé, Jaime, Mantea, Taci e Caio, por me ajudarem a me adaptar em uma nova área e pelas risadas e conversas na salinha do laboratório.

Aos professores que me ajudaram durante este período, Ariela e Massao. Em especial a Ariela por estar sempre preocupada, pela dedicação e carinho. Aos colegas de laboratório destes professores que me ajudaram nas análises.

A CAPES pela bolsa concedida.

Ao meus pais, Sebastião e Edna, amores da minha vida, razão da minha existência. Ao meu irmão Glauber, mesmo falando pouco, sempre me apoiou em momentos difíceis.

As minhas amigas queridas e especiais, Jana e Carla por estarem comigo em todos os momentos, independente da distância. A Janita em especial, minha amiga e irmã, que eu amo muito, estamos passando por mais uma fase de nossas vidas juntas.

Ao meu namorado maravilhoso José Antônio (O Japa), homem da minha vida, meu grande amor, pelo apoio incondicional, sem ele não teria conseguido concluir esse projeto. Obrigada literalmente por tudo, te amo.

“O correr da vida embrulha tudo.

A vida é assim: esquenta e esfria,

Aperta e daí afrouxa,

Sossega e depois desinquieta.

O que ela quer da gente é coragem...”

Grande Sertão Veredas, João Guimarães Rosa.

RESUMO

As enzimas são catalisadores de alto custo, sendo necessário a imobilização para que haja a recuperação e a reutilização tornando o processo viável economicamente. Além disso, a utilização de enzimas imobilizadas permite simplificar o modelo de reatores e o controle da reação. Assim, a imobilização é geralmente um requisito para a utilização de enzimas como biocatalisadores industriais. A escolha do suporte para imobilização depende das propriedades da enzima a ser imobilizada. Suportes sólidos podem interagir com a enzima por diferentes vias: por adsorção, ligação covalente ou encapsulamento. Um importante fator para imobilizar a enzima é que o suporte deve ser inerte e biocompatível ao ambiente, ou seja, não deve interferir na estrutura nativa da proteína e nem comprometer sua atividade biológica. Dentre as principais enzimas, as lipases hidrolisam triglicerídeos (TAG) em glicerol e ácidos graxos e por este motivo estão na classe das hidrolases. Uma proposta de imobilização destas enzimas consiste na utilização de nanoestruturas magnéticas como biocatalisadores da reação de transesterificação para a produção de biodiesel, devido à facilidade e a rápida separação das enzimas imobilizadas, a partir da mistura reacional, usando um campo magnético externo. As vantagens das enzimas imobilizadas em relação às enzimas livres surgem da sua maior estabilidade e facilidade de separação, o que acarreta economia significativa no custo global do processo, desde que o procedimento de imobilização não seja muito caro, haja boa recuperação da atividade enzimática e que a estabilidade operacional da enzima imobilizada seja suficientemente longa. O uso de enzimas imobilizadas permite a retenção do biocatalisador no reator; elevada concentração de catalisador no reator permitindo intensificar o processo; controle do microambiente da enzima; facilidade de recuperação e reutilização do catalisador, o que reduz os custos das enzimas; possibilidade de ser utilizado em sistemas contínuos. Utilizando a técnica de difração de raios X foi possível confirmar a fase magnetita nas sínteses propostas: método de coprecipitação e em meio orgânico. A funcionalização da superfície da NP e SP com APTS, foi comprovado por espectroscopia na região de infravermelho, apresentando bandas de $-NH_2$. A técnica de DLS comprovou a funcionalização, pelo aumento dos diâmetros hidrodinâmicos das amostras NP-APTS e SP-APTS comparada a NP e SP. O ponto isoelétrico das amostras SP e SP-APTS apresentou aumento de 2,33 para 6,44. O derivado imobilizado apresentou bandas típicas de amidas. As lipases imobilizadas apresentaram diâmetros hidrodinâmicos maiores que NP-APTS e SP-APTS. Os resultados da atividade hidrolítica das enzimas suportadas foram satisfatórios, sendo que SP-APTS-LPP apresentou maior atividade. Pela análise termogravimétrica comprovou-se rendimento de imobilização de 22,86%. Determinou-se o pH ótimo da lipase imobilizada que mostrou maior atividade em pH 8 enquanto a LPP livre em pH 6,5. As medidas de temperatura ótima demonstrou que o derivado imobilizado possui maior atividade que a LPP livre a 50 °C, favorecendo a utilização deste suporte em processos industriais de biodiesel que opera em altas temperaturas. Neste contexto, a síntese de suportes magnéticos porosos e a imobilização de lipases com este suporte, apresentou excelentes resultados para a aplicação em biocatálise na reação de transesterificação para a síntese de biodiesel.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas. Imobilização de enzimas. Biodiesel.

ABSTRACT

Enzymes are expensive catalysts, immobilization is necessary for recovery and reuse making the process economically viable. Furthermore, use of immobilized enzymes can simplify model reactor and control reaction. Thus, immobilization is generally a requirement for use of the enzyme as an industrial biocatalyst. The choice of support for biocatalysts immobilization depends on properties of enzyme to be immobilized. Solid supports can interact with enzyme in different ways: by adsorption, covalent bonding or encapsulation. An important factor to immobilize the enzyme is that support must be inert and biocompatible to environment; it should not interfere in native structure of protein and not compromising their biological activity. The main enzymes, lipases hydrolyze triglycerides (TAG) to glycerol and fatty acids and for this reason; they are in the class of hydrolases. These enzymes are carboxylesterases that catalyze hydrolysis in glycerides synthesis. A proposal for immobilization of these enzymes is use of magnetic nanostructures in biocatalysts transesterification reaction for producing biodiesel due to ease and rapid separation of immobilized enzyme, from a mixture reaction using an external magnetic field. The benefits of immobilized enzymes compared to free enzymes arise from their greater stability and ease of separation, which leads to significant savings in the overall cost of the process, provided that immobilization procedure is not very expensive, there is good recovery of enzyme activity, and operational stability of immobilized enzyme is sufficiently long. The use of immobilized enzymes allow retention of biocatalyst in reactor; high concentration of catalyst in reactor to intensify the process; control of microenvironment of enzyme; ease of recovery and reuse of catalyst, which reduces the costs of enzymes; possibility of being used in continuous systems. Using the technique of X-ray diffraction was confirmed magnetite phase in syntheses proposed: co-precipitation method and organic solvent. The functionalization of surface NP and SP with APTS confirmed by spectroscopy in infrared region, with bands of -NH₂. The DLS technique proved the functionalization, the increase of hydrodynamic diameters NP-APTS samples and SP-APTS compared to NP and SP. The isoelectric point of SP and SP-APTS samples increased by 2.33 to 6.44. The immobilized derivative showed typical bands of amides. Immobilized lipases showed higher hydrodynamic diameters NP-APTS and SP-APTS. The results of hydrolytic activity of supported enzymes were satisfactory and SP-APTS-LPP showed higher activity. By thermogravimetric analysis, it was shown immobilization yield 22.86%. It was determined the pH optimum of immobilized lipase showed highest activity at pH 8 while the LPP free at pH 6.5. The optimum temperature measurements demonstrated that immobilized derivative is more active than free LPP at 50 ° C, favoring the use of support in industrial processes of biodiesel, which operates at high temperatures. In this context, the synthesis of porous magnetic support and immobilization of lipases showed excellent results for use in biocatalysis in transesterification reaction for biodiesel synthesis.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Enzymes immobilization. Biodiesel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Efeito do tipo de suporte na estabilidade da enzima imobilizada versus inativação por bolhas de gás.....	16
Figura 2- Conformação da lipase demonstrando o deslocamento da cadeia de polipeptideo.	17
Figura 3- Ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos em baixa força iônica....	18
Figura 4- Esquema representativo das principais reações catalisadas por lipases.	19
Figura 5- Reações para a produção de biodiesel (R-grupo alquil, R1, R2 e R3 são cadeias de ácidos graxos; k1, k2, k3, k4, k5, k6 são catalisadores químicos ou enzimáticos).	19
Figura 6- Reação de transesterificação no processo de biodiesel.....	20
Figura 7- Reação de AGL em meio básico formando sabão	21
Figura 8- Reação de hidrólise na catálise básica.....	21
Figura 9- Reação de esterificação em meio ácido.....	21
Figura 10- Estrutura cristalina da magnetita.	23
Figura 11- Representação da molécula 3-aminopropiltrióxilosilano (APTS).	24
Figura 12- Formação de CLEAs e MCLEAs.	25
Figura 13- Síntese de nanopartículas magnéticas modificadas com grupos aminas.	27
Figura 14- Síntese de suporte magnético poroso modificadas com grupos aminas	27
Figura 15- Esquema do processo de síntese do suporte magnético poroso.....	28
Figura 16- Processo de imobilização. (a) Ativação do suporte magnético e a enzima. (a-1) A partícula Fe_3O_4 modificada com APTS; (a-2) GA foi ligada à nanopartícula funcionalizada com APTS; (a-3) de lipase foi imobilizado sobre a partícula ativada por ligação covalente.	29
Figura 17- Nanopartículas magnéticas e suportes porosos magnéticos sob efeito de campo magnético de um imã de Neodímio. a) Comportamento magnético inicial das nanopartículas e suporte magnético poroso magnéticas. b) Comportamento magnético final após dois minutos.	34
Figura 18- Difratograma de Raios X comparando o padrão magnetita a) com as nanopartículas magnéticas b) com o suporte magnético poroso.....	35
Figura 19- Potencial zeta do SP e SP-APTS.....	37
Figura 20- Imagens do MEV da NP-APTS.	38
Figura 21- Imagens de TEM das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS. a) nanopartículas a 500 nm. b) planos atômicos a 10 nm. c) nanopartículas a 100nm. d) padrão de difração.....	39
Figura 22- Imagens de MEV do suporte magnético poroso.	39
Figura 23- Imagens de MET dos suportes porosos magnéticos funcionalizados com APTS. a) suporte poroso a 100 nm. b) planos atômicos a 10 nm. c) suporte poroso a 20 nm. d) padrão de difração. e) Relação do número de SP-APTS com o diâmetro (nm).....	40
Figura 24- Espectros da região do infravermelho (FT-IR) da LPP.....	41
Figura 25- Espectros da região do infravermelho (FT-IR) das nanopartículas magnéticas..	42
Figura 26- Espectros da região do infravermelho (FT-IR) do suporte magnético poroso.	43
Figura 27- Curvas TG/DTA obtidas para a SP-APTS.....	45
Figura 28- Curvas TG/DTA obtidas para a lipase de pâncreas de porco (livre).	45
Figura 29- Curvas TG/DTA obtidas para a lipase de pâncreas de porco imobilizada com SP-APTS.....	46
Figura 30- Atividade relativa (%) da LPP livre e NP-APTS-LPP em função do pH.	49
Figura 31- Atividade relativa (%) da LPP livre e NP-APTS-LPP em função	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Massa pesada no início do processo da análise térmica.....	33
Tabela 2- Média do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade.....	36
Tabela 3- Média do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade.....	44
Tabela 4- Atividade Enzimática das imobilizações com NP-APTS, SP-APTS e LPP livre....	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGAE	ácidos graxos acil ésteres
AGL	ácidos graxos livres
APTS	3-aminopropiltrietoxisilano
CNTs	nanotubo de carbono
CLEAs	aglomerados de enzimas por ligação cruzada
CLECs	cristais de enzimas por ligação cruzada
DEA	dietanolamina
DEG	dietilenoglicol
GA	glutaraldeído
LPP	lipase pancreática de porco
MCLEAs	aglomerados de enzimas e nanopartículas magnéticas por ligação cruzada
Nanoesfera	suporte magnético poroso
NP	n nanopartículas superparamagnéticas
NP-APTS	n nanopartículas funcionalizadas com grupos amina
NP-APTS-LPP	n nanopartículas funcionalizadas com grupos amina ligados com a LPP
SP	suporte magnético poroso
SP-APTS	suporte magnético poroso funcionalizado com grupos amina
SP-APTS-LPP	suporte magnético poroso funcionalizado com grupos amina ligados com a LPP
TAG	triglicerídeos
UV-vis	ultravioleta no visível

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	MÉTODOS DE IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS UTILIZANDO NANOPARTÍCULAS	15
2.2	LIPASES	16
2.3	PRODUÇÃO DE BIODIESEL	20
2.4	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS COM NANOPARTÍCULAS SUPERMAGNÉTICAS E SUPORTE MAGNÉTICO POROSO DE FERRO	22
2.5	ATIVAÇÃO DA ENZIMA E DAS NANOESTRUTURAS MAGNÉTICAS	24
3	OBJETIVO GERAL	25
3.2	ESPECÍFICOS	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	REAGENTES	26
4.2	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS SUPERPARAMAGNÉTICAS FUNCIONALIZADAS COM APTS	26
4.3	SÍNTESE EM MEIO ORGÂNICO DOS SUPORTES MAGNÉTICOS POROSOS RECOBERTAS COM GRUPOS AMINAS NA SUPERFÍCIE	27
4.4	IMOBILIZAÇÃO DA LPP EM NP-APTS E SP-APTS	29
4.5	ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LIPASE IMOBILIZADA COM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS E SUPORTES POROSOS MAGNÉTICOS.....	30
4.6	TÉCNICAS EMPREGADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
4.6.1	<i>Difração de Raio X (DRX)</i>	30
4.6.2	<i>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</i>	31
4.6.3	<i>Potencial Zeta</i>	31
4.6.4	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS)</i>	31
4.6.5	<i>Microscopia eletrônica de varredura (FEG-MEV)</i>	32
4.6.6	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET)</i>	32
4.6.7	<i>Medidas de umidade da amostra utilizando balança de infra-vermelho.</i>	32
4.6.8	<i>Análise Térmica (TG/DTA)</i>	33
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
5.1	SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO ÓXIDO DE FERRO FUNCIONALIZADOS COM APTS	33
5.2	IMOBILIZAÇÃO DA LPP EM NP-APTS E SP-APTS	41
5.3	ATIVIDADE HIDROLÍTICA DA LPP IMOBILIZADA COM NANOPARTÍCULAS E SUPORTE MAGNÉTICO POROSOS MAGNÉTICAS	47
6	CONCLUSÕES	50
7	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	52
	REFERÊNCIAS.....	53

1 INTRODUÇÃO

Enzimas são altamente específicas e suas propriedades e formas de aplicação podem ser melhoradas utilizando métodos de imobilização. Este processo pode conferir maior estabilidade e resistência em diferentes faixas de pH e temperatura, além de preservar a atividade da enzima por vários ciclos catalíticos.¹ A imobilização da enzima é aplicada eficientemente em diferentes segmentos, tais como, biocatálise em alimentos, em processos químicos e na indústria farmacêutica. Para que o uso de enzimas por imobilização seja viável economicamente considere-se o tipo de suporte utilizado, o método selecionado deve ter alta influência na atividade e reutilização da enzima na biocatálise.^{2,3}

A escolha do suporte depende de suas propriedades e da enzima a ser imobilizada. Suportes sólidos podem interagir com a enzima por diferentes vias: por adsorção, ligação covalente ou encapsulamento.⁴ Um importante fator para imobilizar a enzima é que a matriz deve ser inerte e biocompatível ao ambiente, ou seja, não deve interferir na estrutura nativa da proteína e nem comprometer sua atividade biológica.⁵

A utilização de enzimas imobilizadas com nanopartículas possibilita a retenção do biocatalisador no reator, elevada concentração de catalisador no reator permitindo intensificar o processo, controle do microambiente da enzima; facilidade de recuperação e reutilização do catalisador, assim como os suportes citados nos exemplos anteriores, o que reduz os custos das enzimas e a possibilidade de ser utilizado em sistemas contínuos.

No caso de enzimas suportadas com nanopartículas magnéticas, além das justificativas destacadas acima, o suporte magnético possibilita o uso de separação magnética para a recuperação do derivado enzimático, podendo ser reutilizado em diversos ciclos produtivos. Desta forma, a tecnologia de imobilização de lipases em suporte magnético proposta neste trabalho pode proporcionar uma redução no custo e tempo de operação em síntese de biodiesel via enzimática.

2 REVISÃO DA LITERATURA

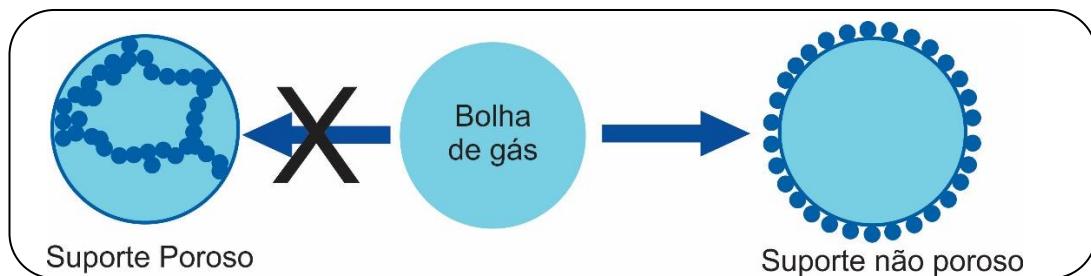
2.1 Métodos de imobilização de enzimas utilizando nanopartículas

As nanopartículas apresentam propriedades eletrônicas, magnéticas, ópticas, físicas e químicas diferentes de sólidos extendidos.⁶ A literatura mostra alguns exemplos de nanopartículas para imobilização de enzima, como: nanotubo de carbono (CNTs), nanopartículas magnéticas, mesoporos, nanofibras, nanocompósitos, nanobastões e materiais obtidos por sol-gel contendo partículas de tamanho na ordem de nanômetros.⁷ Alguns tipos de materiais mesoporosos, incluindo nanodiamante, sílica mesoporosa e nanotubos de carbono são escolhidos como suporte de enzimas por possibilitarem a reutilização em vários ciclos catalíticos. Entretanto, a preparação complexa e o alto custo destes suportes torna o uso inviável, havendo preferência para a utilização de nanopartículas, pois estas são quimicamente estáveis, possuem tamanho uniforme e boa dispersão líquida, sendo facilmente aplicadas em processos de alta escala industrial.⁸

Os materiais constituídos de poros de sílica têm aplicação na imobilização de enzimas para biocatálise e biossensores, por apresentarem estruturas de poros bem ordenados, distribuição de poros estreitos, grandes áreas de superfície, alta estabilidade e pela possibilidade de funcionalização por uma gama de ligantes orgânicos e incorporação de metais.⁹

A imobilização da enzima dentro da estrutura do poro da sílica permite que as moléculas de enzima estejam homogeneousmente dispersas, não havendo interação com a interface externa. Esta imobilização estabiliza a enzima impedindo a interação com as moléculas do extrato enzimático, evitando agregação, autólises ou proteólises do extrato das proteínas (que será totalmente dispersada e imobilizada). As moléculas de enzimas imobilizadas não entrarão em contato com a interface externa, por exemplo, bolhas de ar originadas a partir de gases ou promovidas por forte agitação, para controlar o pH. Algumas bolhas de gás podem tornar a enzima inativa nas soluções de proteína, mas não inativam a enzima imobilizada no poro do sólido,^{10,11} conforme modelo apresentado na figura 1.

Figura 1- Efeito do tipo de suporte na estabilidade da enzima imobilizada versus inativação por bolhas de gás.



Fonte: Adaptado de CESAR (2007, p. 1452).¹²

Na presença de um solvente de fase orgânica, a enzima imobilizada pode entrar em contato com as moléculas do solvente que são solúveis na fase aquosa, mas não com a interface de fase orgânica, evitando a inativação. No entanto, esta estabilização não é a melhor opção associada à imobilização, por este motivo à preferência pela utilização de nanopartículas magnéticas.^{13,14} Os mecanismos de estabilização de enzima descritos acima são modificados neste caso, devido a capacidade de interação das enzimas imobilizadas com a superfície das nanopartículas. Porém esta situação pode ser resolvida por meio de estratégias apropriadas (por exemplo, modificando as enzimas imobilizadas com a dextrana).¹⁴

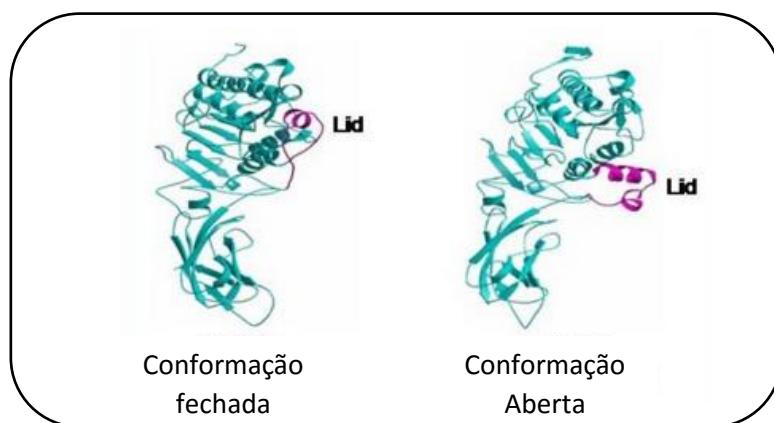
2.2 Lipases

As lipases são enzimas (biocatalisadores) que hidrolisam triglicerídeos (TAG) em glicerol e ácidos graxos e por este motivo estão na classe das hidrolases.^{15,16,17} As lipases são melhor definidas como carboxilesterases que catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de acilgliceróis¹⁸. Estas enzimas são classificadas com base na sua origem: lipases vegetais, que são obtidas a partir do látex do mamão, aveia e sementes de mamona¹⁹ e não são comercialmente usadas, enquanto que as lipases de origem animal e microbiana são utilizadas com maior frequência. A lipase animal é encontrada no pâncreas de bovinos, ovinos, suínos¹⁹ e lipases microbianas têm grande importância industrial estando disponíveis a granel²⁰.

Um procedimento de imobilização quando eficiente permite que as enzimas mantenham alta atividade catalítica após a imobilização, devendo-se considerar a estrutura da enzima. Por exemplo, a lipase possui duas conformações, a forma

fechada que é considerada inativa, onde o sitio ativo é isolado do meio da reação por uma cadeia de polipeptídeo chamada "lid", e na forma aberta, a "lid" é deslocada e o sítio ativo é totalmente exposto à reação,²⁰ como demonstrado na figura 2. Ambas as formas da lipase têm o equilíbrio afetado pelas condições experimentais. Na presença de gotas hidrofóbicas de substrato, as lipases tornam-se fortemente adsorvidas na interface dessas gotas e o equilíbrio conformacional é deslocado para a forma aberta.

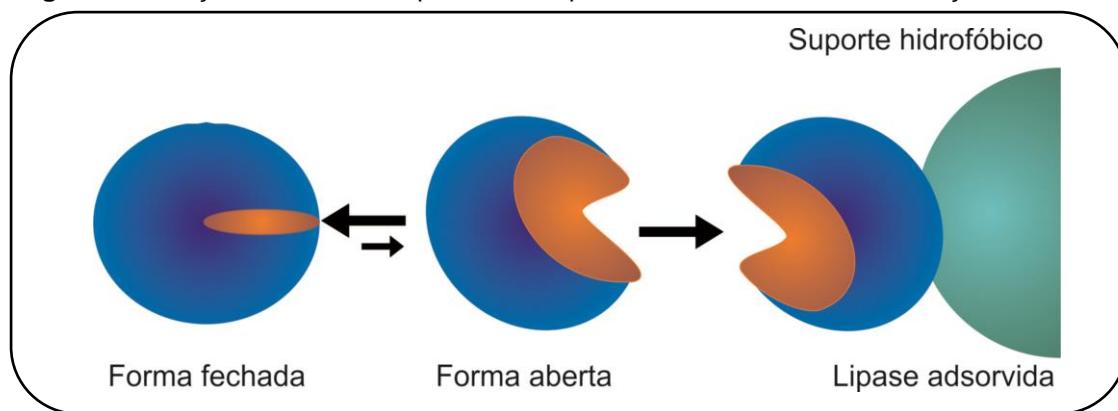
Figura 2- Conformação da lipase demonstrando o deslocamento da cadeia de polipeptídio.



Fonte: PALOMO (2003, p. 2).²¹

A partir dessas características é possível realizar duas estratégias para melhorar a imobilização das moléculas de lipase garantindo sua conformação na forma aberta. A primeira opção é adsorção da lipase em suporte hidrofóbico em meio com baixa força iônica (e.g., 5-25 mM fosfato de sódio), condições onde outras enzimas não podem ser imobilizadas. Quando as áreas hidrofóbicas que cercam o sítio ativo da proteína se adsorvem ao suporte, a forma aberta da lipase torna-se mais estável como observado na Figura 3.²² A imobilização de lipases por encapsulação em sol-géis hidrofóbicos também possui alta atividade de recuperação.²³ Entretanto, se o substrato é grande ou hidrofílico, a presença da superfície do suporte hidrofóbico pode gerar impedimento estérico, e consequentemente reduzir a atividade da lipase.

Figura 3- Ativação interfacial de lipases em suportes hidrofóbicos em baixa força iônica.

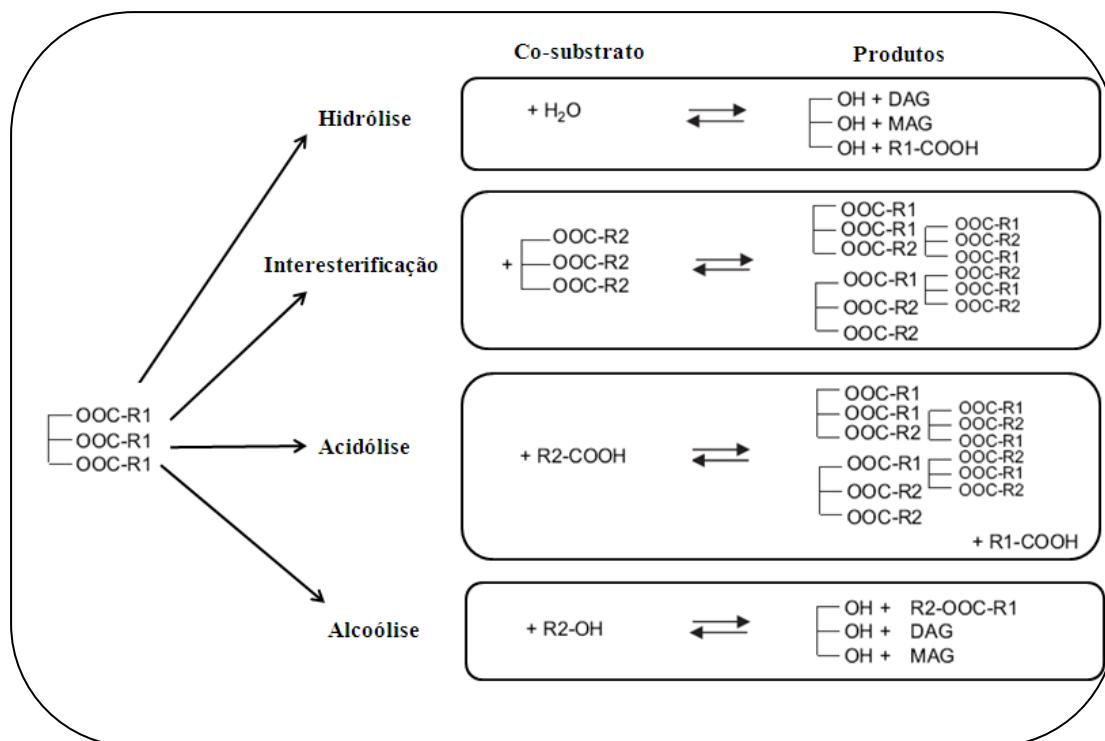


Fonte: Adaptado de CESAR (2007, p. 1456).

A preparação de CLEAs (*Cross-Linked Enzyme Aggregates*) de lipases na presença de detergentes melhoram a atividade da lipase, mantendo a forma aberta durante a reticulação.²⁴ Alguns CLEAs podem ser utilizados em qualquer meio de reação sem o risco de redissolução. Outra estratégia consiste na estabilização da forma aberta da lipase adsorvida em suportes funcionalizados com grupos amina. Para isto, as lipases são incubadas na presença de detergentes e posteriormente é feita a reticulação com glutaraldeído, promovendo a interação entre os grupos aminas adicionadas na superfície do suporte com a enzima de interesse.²⁵ Nesta proposta, é necessário alcançar uma estrutura suficientemente rígida da enzima que não movimente o “lid”.

A lipase tem a característica única de atuar entre a interface das fases aquosa e não aquosa, isso permite que a enzima realize a catálise de muitas reações ilustradas na figura 4,⁵⁵ incluindo a hidrólise, interesterificação e a alcoólise.²⁶ O modo de ação desta enzima na transesterificação do substrato para produção de biodiesel depende da sua origem e de suas propriedades específicas. As lipases catalisam a transesterificação entre triglicerídeos e receptores acil (álcool), através da formação de intermediários acil enzima que posteriormente irão doar a porção acilo para produzir ácidos graxos acil ésteres (AGAE).²⁷

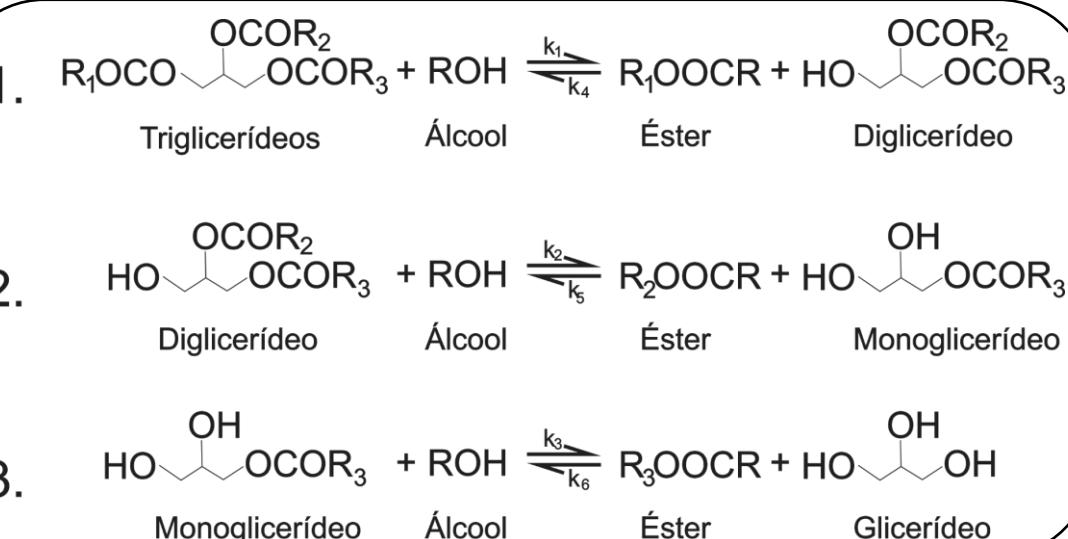
Figura 4- Esquema representativo das principais reações catalisadas por lipases.



Fonte: PAULA (2012, p. 47).

Para a produção de biodiesel, as lipases devem ser capazes de converter todos os três tipos de glicerídeos (monoglycerídeos, diglycerídeos e triglycerídeos) em ésteres, conforme ilustrado na figura 5.²⁸

Figura 5- Reações para a produção de biodiesel (R-grupo alquil, R1, R2 e R3 são cadeias de ácidos graxos; k1, k2, k3, k4, k5, k6 são catalisadores químicos ou enzimáticos).



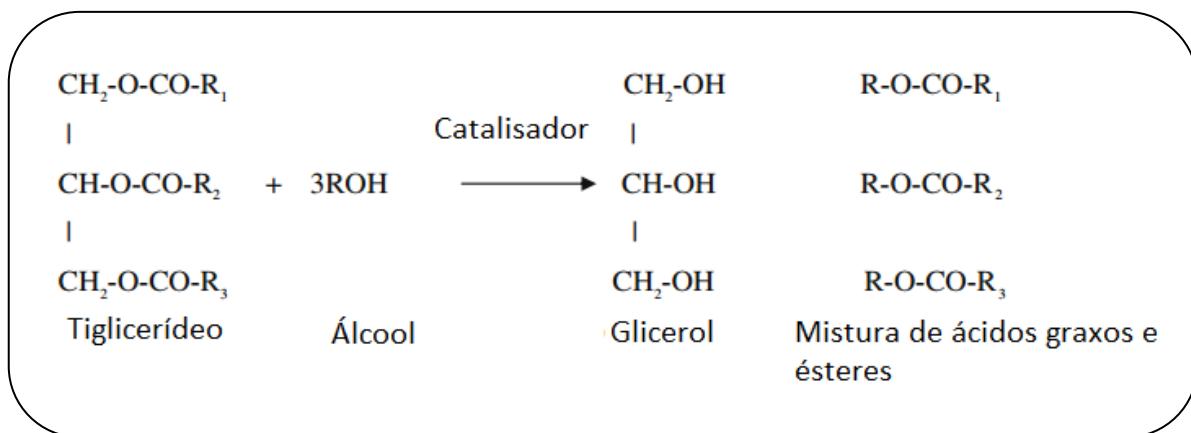
Fonte: Adaptado de LEW (2014, p. 499).²⁹

2.3 Produção de biodiesel

O biodiesel é um combustível alternativo feito a partir de fontes biológicas renováveis. É biodegradável e não tóxico, tem um perfil baixo de emissões de poluentes e desta forma o biodiesel tem o potencial de reduzir o nível de poluentes carcinogênicos sendo um combustível benéfico ao meio ambiente.²⁸ Quimicamente, o biodiesel é uma mistura de ésteres metílicos de ácidos graxos e é normalmente feita a partir de recursos biológicos não tóxicos, tais como óleos vegetais,^{30,31} gorduras animais,^{30,32,33,34} ou óleos de alimentos já usados.³⁵

Os óleos vegetais ou de gorduras animais são os ésteres de ácidos monocarboxílicos saturados e insaturados ligados à cadeia do glicerol. Estes ésteres são chamados de triglicerídeos, que podem reagir com álcool na presença de um catalisador, um processo conhecido como transesterificação. A forma simplificada desta reação química é apresentada na figura 6:

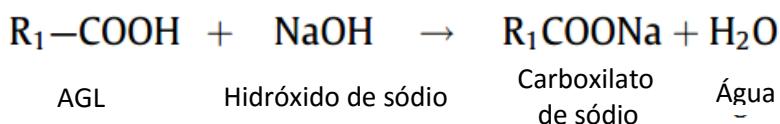
Figura 6- Reação de transesterificação no processo de biodiesel.



Fonte: LEUNG (2010, p. 1085).³⁶

Óleos e gorduras vegetais podem conter pequenas quantidades de água e ácidos graxos livres (AGL). A transesterificação por catálise alcalina é a mais utilizada nas usinas de biodiesel, onde o catalisador alcalino reage com AGL formando sabão, conforme a figura 7. Esta reação é indesejável, pois o sabão produzido diminui o rendimento do biodiesel inibindo a separação dos ésteres do glicerol. Além disso, o sabão se liga ao catalisador, sendo necessário aumentar sua quantidade implicando em maior custo ao processo.³⁷

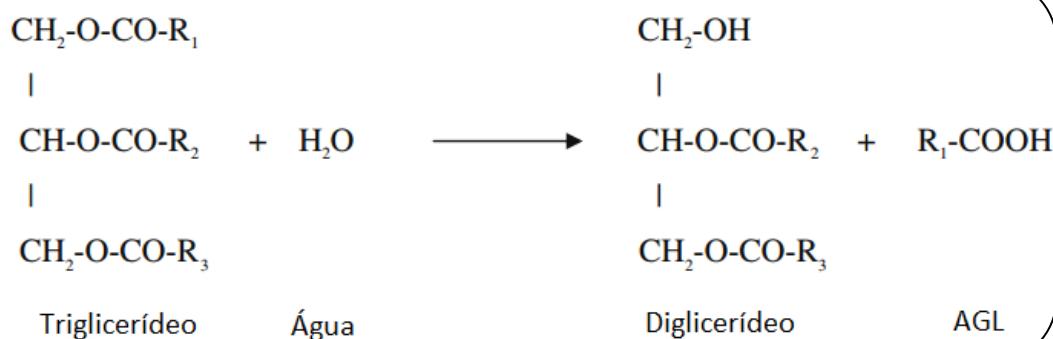
Figura 7- Reação de AGL em meio básico formando carboxilato de sódio (sabão).



Fonte: Adaptado de LEUNG (2010, p. 1085).

A água que se originou a partir de óleos e gorduras ou formada durante a reação de saponificação, retarda a transesterificação através da reação de hidrólise. A hidrólise dos triglicéridos leva a formação de diglicérideos e maior quantidade de AGL. . A hidrólise típica da reação é mostrada na figura 8:

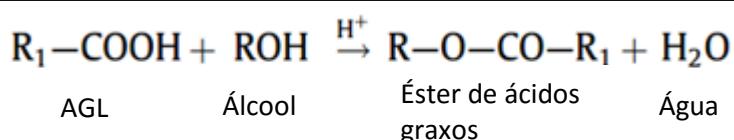
Figura 8- Reação de hidrólise na catálise básica.



Fonte: Adaptado de LEUNG (2010, p.1086)

Este excesso de AGL pode reagir com o álcool formando o éster (biodiesel) por uma reação de transesterificação catalisada por ácido (Figura 9). Normalmente, o catalisador para esta reação é o ácido sulfúrico concentrado, mas devido à velocidade de reação lenta e a elevada quantidade de metanol (por razão molar de óleo), a transesterificação ácida não ganhou tanta atenção como a transesterificação alcalina.³⁷

Figura 9- Reação de esterificação em meio ácido.



Fonte: Adaptado de LEUNG (2010, p. 1085).

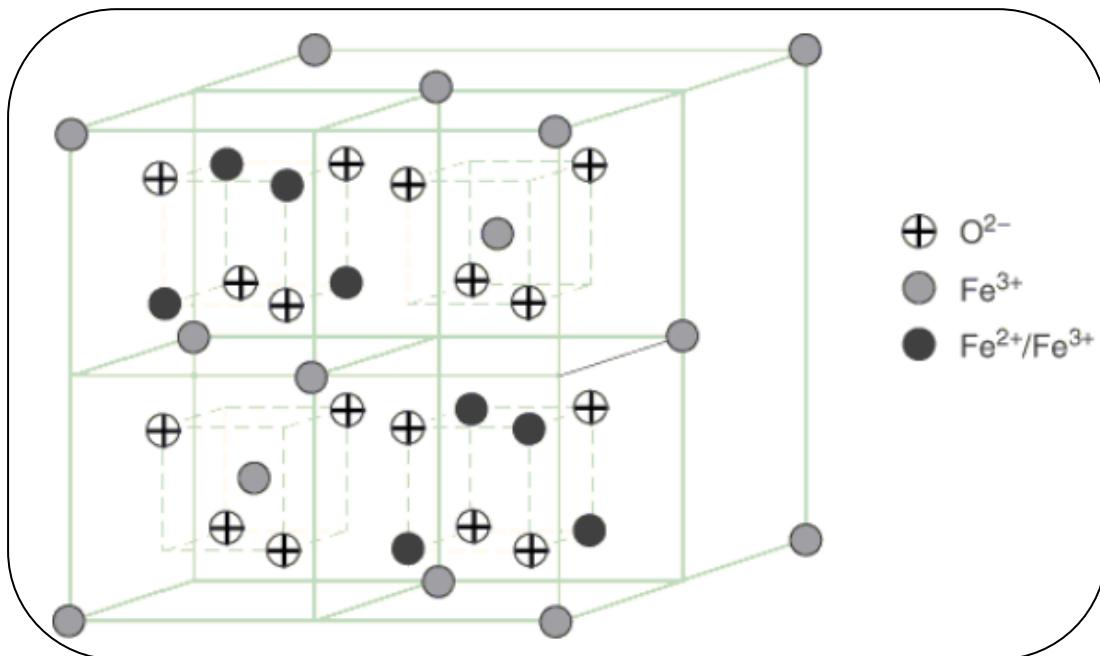
A transesterificação alcalina homogênea fornece as taxas de reação mais rápida, mas também apresenta saponificação indesejável, o que reduz a eficiência na produção de biodiesel. Uma alternativa proposta para solucionar este problema é a transesterificação catalisada por lipases que são os melhores biocatalisadores para a modificação de óleos.

2.4 Imobilização de enzimas com nanopartículas supermagnéticas e suporte magnético poroso de ferro

A opção de suporte mais viável na área industrial para imobilizar enzimas é a utilização de compostos magnéticos, por exemplo, a aplicação de nanopartículas de óxido de ferro.^{38,39,40} O uso deste suporte reduz o custo da operação, as nanopartículas magnéticas podem ser separadas das reações do sistema e estabilizadas em um fluído aplicando um campo magnético externo. Nanopartículas superparamagnéticas (NP) como a magnetita (Fe_3O_4) e a forma oxidada maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) apresentam excelentes características, como grande área superficial, mobilidade e alta transferência de massa, que favorecem a imobilização de aminopeptase, lipase, lisozima, pectinase, fosfatase, glicose, oxidase, glicosidase, celulase, epóxido, hidrolase, esterase, polimerase, entre outras enzimas⁴¹.

A estrutura cúbica espinélio Fe_3O_4 representa uma classe importante dos materiais magnéticos de óxido de ferro, onde o oxigênio forma um empacotamento octaédrico e M^{2+} e Fe^{3+} ocupam sítios tetraédricos ou interstícios octaédricos^{42,43} como representado na figura 10.

Figura 10- Estrutura cristalina da magnetita.



Fonte: GOSSUIN (2009, p. 299)⁴⁴.

Outra opção são os suportes porosos superparamagnéticos de óxido de ferro (SP) que têm recebido também grande atenção da comunidade científica por suas características, tais como o tamanho controlável, baixa toxicidade, alta capacidade de dispersão líquida, propriedade magnética única, alta magnetização, modificação funcional e fácil manipulação em campos magnéticos baixos.

A imobilização da lipase em NP e SP é utilizada visando originar derivados imobilizados, que serão empregados para catalisar a reação de transesterificação para produção de biodiesel, devido principalmente à grande facilidade e a rápida separação das lipases imobilizadas da mistura. Estes suportes com baixa toxicidade possuem superfície quimicamente modificável e boa capacidade de reutilização.

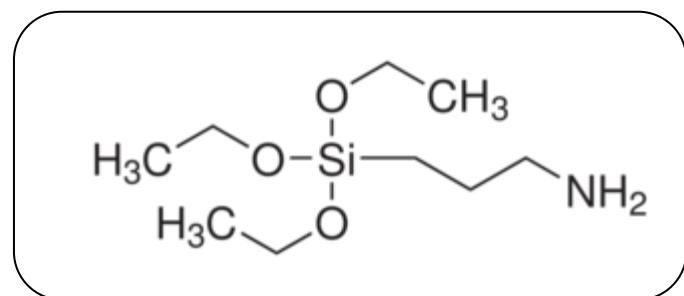
Devido à atração dipolar anisotrópica, as nanopartículas magnéticas não modificadas tendem a formar aglomerados, e consequentemente perdem as suas propriedades específicas associadas com ao monodomínio, sendo necessário à funcionalização da superfície com grupos orgânicos. Além disso, o óxido de ferro sem modificação superficial é facilmente oxidado quando submetido a um sistema biológico.⁴⁵

Muitas enzimas foram imobilizadas em superfícies de NP e SP por meio de uma ampla variedade de grupos funcionais, incluindo amina, aldeído, carboxílico,

epóxi e maleimida. Com a funcionalização, as atividades enzimáticas e as estabilidades foram significativamente melhoradas.⁴¹

A estrutura do 3-aminopropiltetoxisilano (APTS), figura 11, é um organosilano, uma molécula bifuncional contendo grupos alcóxidos que podem se ligar covalentemente aos grupos oxigênio na superfície das nanopartículas, modificando-as com grupos amina (-NH₂).⁴⁶

Figura 11- Representação da molécula 3-aminopropiltetoxisilano (APTS).



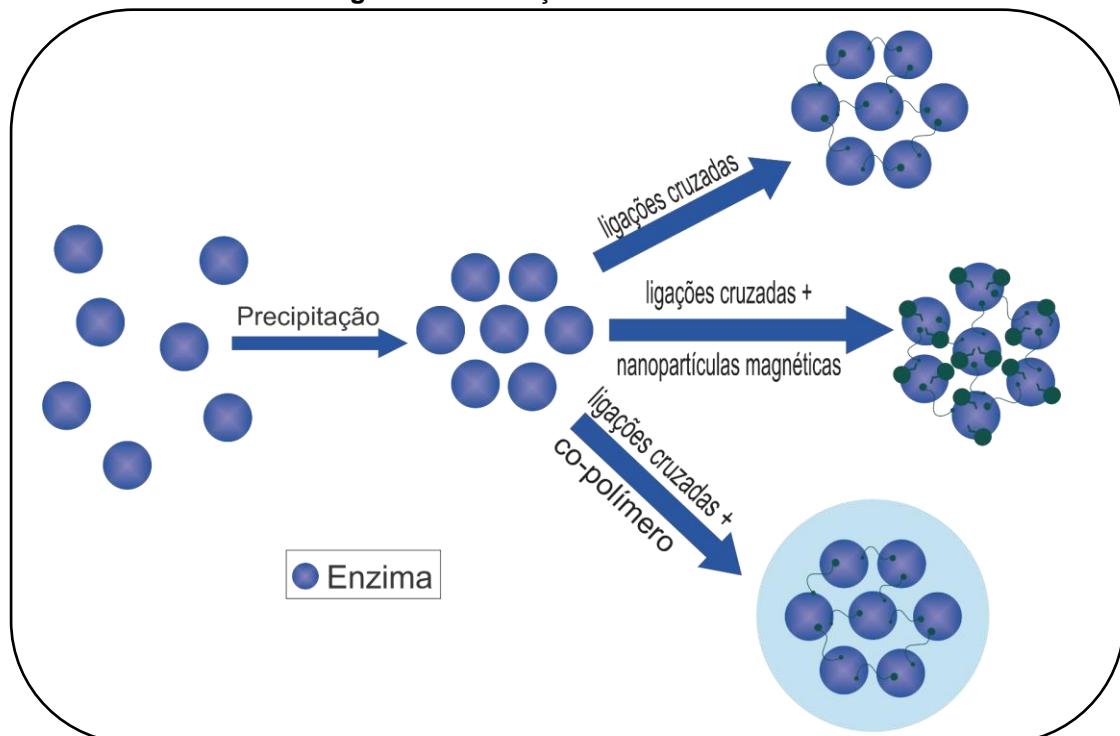
Fonte: Elaborada pela autora.

2.5 Ativação da enzima e das nanoestruturas magnéticas

Para aumentar a estabilidade operacional da lipase em suportes sólidos magnéticos e consequentemente a eficiência de imobilização é realizada a ativação das nanopartículas magnéticas. Suportes ativados com epóxi, por exemplo, são muito estáveis em meio aquoso e formam ligações covalentes à temperatura ambiente com grupos funcionais da enzima, tais como, amina, tiol e fenol. Além disso, os grupos epóxi podem ser facilmente incorporados a outros grupos funcionais por copolimerização de monômeros que possuem grupos reativos.⁴⁷ No entanto, a melhor alternativa é a utilização de glutaraldeído (GA) para ativação de suportes. Alonso et al.⁴⁸ afirmam que o tratamento com glutaraldeído melhora a estabilidade da enzima sem promover alterações consideráveis na sua atividade. Além disso, este composto pode ser usado na imobilização das enzimas com nanopartículas magnéticas, como agente de reticulação, pois possui baixo custo e pode ser facilmente encontrado em grandes quantidades⁴⁹. A figura 12 ilustra a formação de agregados de enzimas reticulados (CLEAs). Esta metodologia combina a purificação e imobilização em uma única operação.

Os CLEAs são uma nova tecnologia para a imobilização de enzimas, que está associada também a imobilização de enzimas em nanoestruturas. CLEAs podem ser obtidos e reticulados na presença de nanopartículas magnéticas funcionalizadas, formando os MCLEAs.⁵⁰

Figura 12- Formação de CLEAs e MCLEAs.



Fonte: Adaptado de CIOLATTI (2014, p. 59).⁵¹

3 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi sintetizar suportes magnéticos porosos e não porosos para a imobilização de lipases com vista à aplicação em reações de transesterificação para a síntese de biodiesel.

3.2 Específicos

- Aprimorar os conhecimentos das técnicas e métodos utilizados na execução do trabalho.
- Avaliar a influência do tamanho das nanopartículas na atividade recuperada das enzimas imobilizadas;

- Estudar a influência da presença de poros nos suportes magnéticos obtidos na presença de dietanolamina (DEA);
- Estabelecer os parâmetros de funcionalização de superfície de nanopartículas com vista à imobilização com enzimas;
- Estudar a estabilidade coloidal das suspensões de nanopartículas imobilizadas com lipase;
- Analisar o efeito da temperatura e pH na atividade hidrolítica das enzimas.

4 Materiais e métodos

4.1 Reagentes

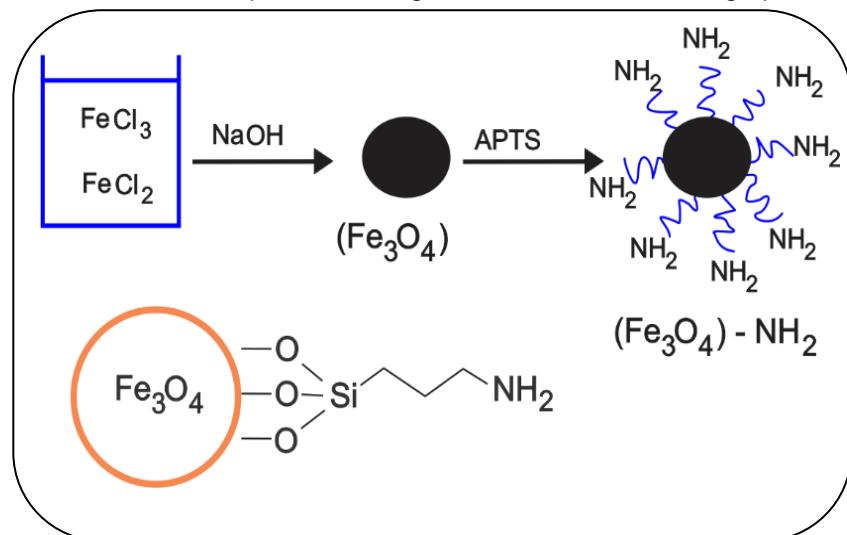
Os reagentes utilizados durante a síntese e a caracterização das amostras apresentam pureza analítica e não houve tratamento prévio de purificação. Os sais, ácidos e bases utilizados foram: cloreto de ferro (II) tetrahidratado (99%, Sigma Aldrich), cloreto de ferro (III) hexahidratado (99%, Sigma Aldrich), cloreto de sódio (97%, Mallincrodt), hidróxido de sódio (97%, Synth). Foram utilizados como solvente dietanolamina (DEA) (98%, Sigma Aldrich), dietilenoglicol (DEG) (99%, Sigma Aldrich), glutaraldeído (25%, Sigma Aldrich), tampão fosfato (pH 7,4, Sigma Aldrich). Para a imobilização foi utilizada a lipase pancreática de porco (LPP, Sigma Aldrich), polietilenoglicol (PM 1000, Sigma Aldrich) e 3-aminopropiltrióxilosilano (Sigma Aldrich). Os outros reagentes utilizados foram: Acetona p.a. (Merck); Etanol comercial; goma arábica em pó pura (Synth). Para as sínteses que necessitaram de atmosfera inerte e livre de oxigênio foi utilizado o gás argônio (Ar) comercial. Os demais materiais e reagentes foram adquiridos comercialmente em grau analítico.

4.2 Síntese das nanopartículas superparamagnéticas funcionalizadas com APTS

Conforme modelo ilustrado na figura 13, as nanopartículas magnéticas foram obtidas a partir da dissolução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ na proporção (1:2, respectivamente) em 10 mL de água destilada. Foi preparada uma solução de hidróxido de sódio em água destilada até atingir pH entre 11 e 13. Essa solução foi

aquecida, sob agitação, até 80°C e posteriormente foram adicionados 1,6 mL da solução contendo Fe²⁺/ Fe³⁺ e 200 µL de 3-aminopropiltrimetoxissilano (APTS) dispersadas no ultrassom por 1 hora. Após o término do experimento foram realizadas três lavagens com água destilada descartando-se o sobrenadante, e as nanopartículas foram armazenadas em tubos *falcon*.⁵²

Figura 13- Síntese de nanopartículas magnéticas modificadas com grupos aminas.

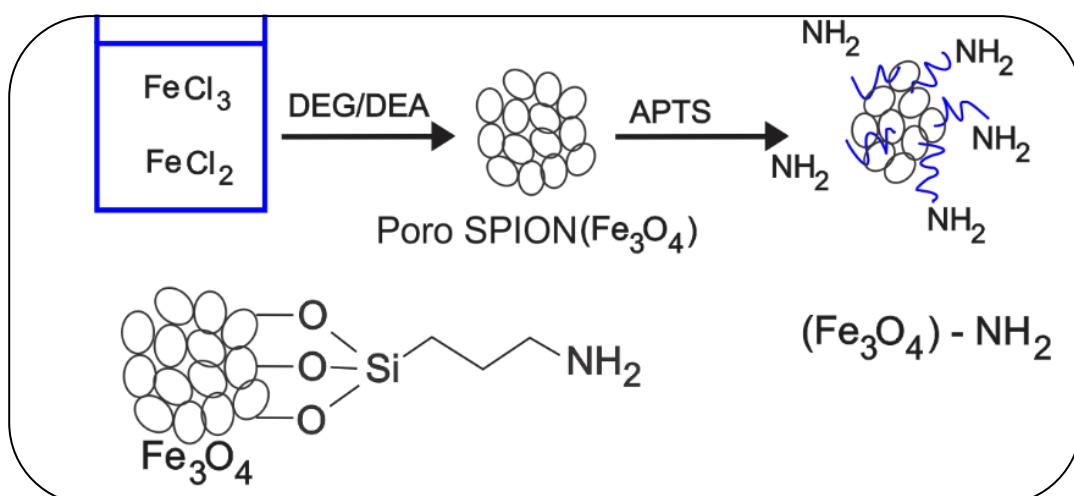


Fonte: Elaborada pela autora.

4.3 Síntese em meio orgânico dos suportes magnéticos porosos recobertas com grupos aminas na superfície

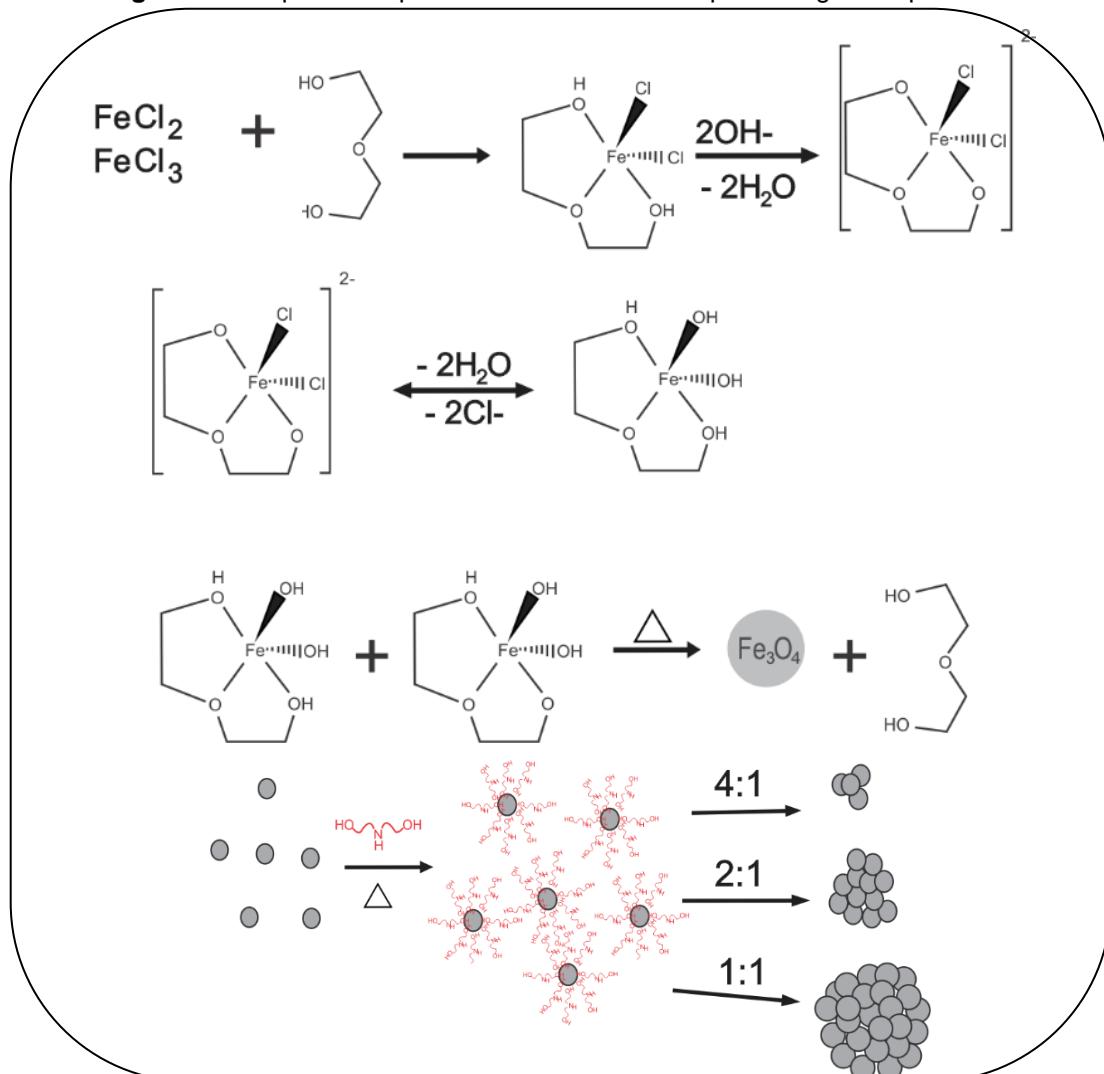
Os suportes magnéticos porosos (Figura 14) foram obtidos pela dissolução de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (2mmol) e $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (4mmol) em 25 mL de DEG/DEA (1:1). Em um bêquer foi dissolvido sob aquecimento de NaOH (16mmol) em 12,5 mL de DEG/DEA (1:1). As soluções de $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ / $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ e de NaOH foram colocadas no balão de destilação em refluxo. O sistema foi completamente fechado. Borbulhando-se argônio, sob agitação, à 200°C, por 8 horas. Um controlador de temperatura foi utilizado para auxiliar durante a reação. Posteriormente a amostra foi lavada com álcool e água e centrifugada até a retirada de todo o solvente, obtendo-se assim o suporte magnético poroso.⁵³ A figura 15 ilustra o mecanismo de reação desta síntese.

Figura 14- Síntese de suporte magnético poroso modificado com grupos aminas



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 15- Esquema do processo de síntese do suporte magnético poroso.

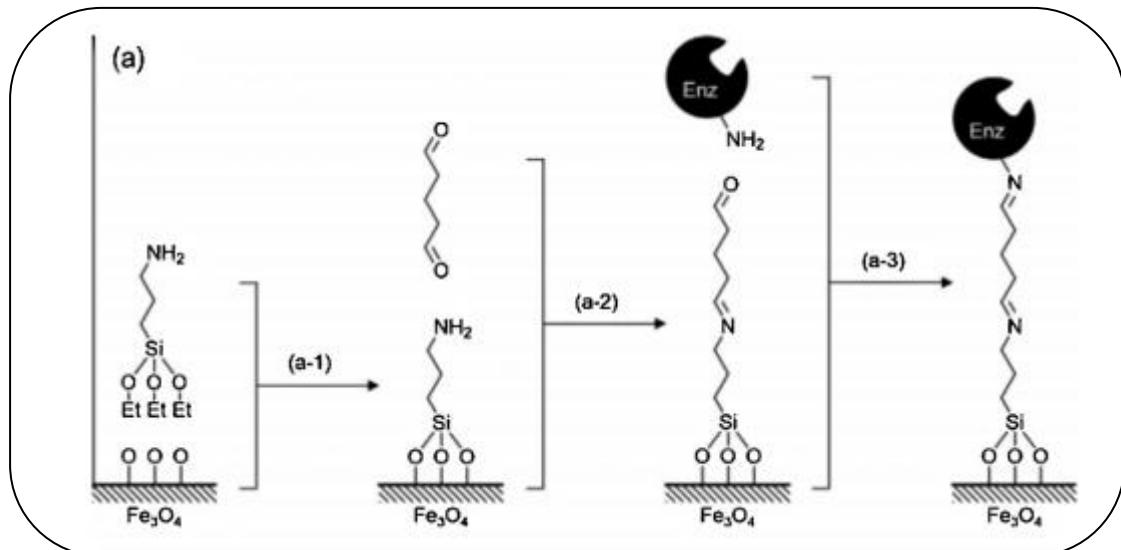


Fonte: Adaptado de GAO (2014, p. 20844).⁵³

4.4 Imobilização da LPP em NP-APTS e SP-APTS

Uma alíquota de 5 mL de nanopartículas e suportes magnéticos porosos funcionalizado com APTS foi retirada e adicionada em um tubo *falcon* que continha 18 mL de tampão fosfato 7,4. Posteriormente foram adicionados 2 mL de glutaraldeído (25%); a solução foi agitada em um vórtex e logo após permaneceu em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. Lavou-se com álcool, água e solução tampão (duas vezes com cada solvente) para garantir a retirada do glutaraldeído. Pesaram-se 50 mg de lipase pancreática de porco (LPP) e 0,01 g de polietilenoglicol. Ambos que foram adicionados na solução tampão com as nanopartículas e/ou suporte magnético poroso. Foi realizada a agitação no vórtex por 5 minutos. A solução permaneceu em repouso por 16 horas sob temperatura de 6°C. Com a ajuda de um imã, a solução foi lavada 5 vezes com tampão fosfato (pH 7,4) para a retirada de LPP livre. O esquema de imobilização da LPP é apresentado na figura 16.

Figura 16- Processo de imobilização. (a) Ativação do suporte magnético e a enzima. (a-1) A partícula Fe_3O_4 modificada com APTS; (a-2) GA foi ligada à nanopartícula funcionalizada com APTS; (a-3) de lipase foi imobilizado sobre a partícula ativada por ligação covalente.



Fonte: Adaptado de MENG (2014, p. 321).⁵⁴

4.5 Atividade hidrolítica da lipase imobilizada com nanopartículas magnéticas e suportes porosos magnéticos.

Foram misturados 2,5 mL de emulsão de azeite de oliva e água (1:1) e 2 mL de tampão fosfato (pH 8,0; 0,1 mol/L). O sistema reacional foi mantido sob agitação em banho termoestatizado com agitação de 150 rpm. Em seguida foram adicionados 2 mL da solução enzimática imobilizada, mantendo o sistema sob agitação, a 37 °C, por 5 minutos. Após o período de incubação foram adicionados 10 mL de uma mistura de etanol e acetona (1:1) e 10 mL de uma solução de KOH previamente padronizado (0,05 mol/L). O excesso de KOH foi titulado com HCl previamente padronizado (0,05 mol/L). A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 1:⁵³

$$A = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 10^6}{t \times m} \quad (1)$$

Em que, A= Atividade enzimática (U/g), V_b= Volume do branco (L), V_a= Volume da amostra (L), M= Molaridade da solução de HCl (mol/L), t= Tempo de incubação (min) e m= massa do biocatalisador adicionado (g).

Utilizando este método foram realizadas análises, mantendo a temperatura constante de 37° C, variando os tampões em diferentes pHs 3, 4, 5, 6, 7, 8 e 9. Após o estabelecimento do pH ótimo da enzima, utilizou-se o mesmo procedimento variando-se a temperatura. As temperaturas avaliadas: 40, 45, 50, 55 e 60° C, a fim de se determinar a temperatura ótima de atividade do biocatalisador.

4.6 Técnicas empregadas para a caracterização das amostras

4.6.1 Difração de Raio X (DRX)

As amostras foram caracterizadas em um difratômetro da Siemens, modelo D5005. Usando radiação K_α, com comprimento de onda (λ) igual a 0,15418 nm. As medidas foram feitas em um intervalo de varredura 2θ de 20° a 80°, com velocidade de varredura 0,02° por segundo. Todas as amostras foram analisadas na forma de pó.

4.6.2 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo reflectância em um equipamento da PerkinElmer, modelo Frontier, para identificar a composição das nanopartículas e da lipase. As amostras foram maceradas, dispersas em KBr e prensadas em forma de pastilhas. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹.

4.6.3 Potencial Zeta

O potencial Zeta foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern. O equipamento calcula o potencial Zeta a partir de valores de mobilidade eletroforética, aplicando a equação de Henry representada abaixo (equação 2). A mobilidade eletroforética é medida aplicando potencial em cada eletrodo da cubeta. As partículas carregadas migram para o eletrodo de carga oposta quando sua velocidade é determinada. As amostras foram dispersas em uma solução aquosa de NaCl 0,001 mol/L. As amostras foram tituladas no intervalo de pH de 3 a 10 e o potencial Zeta foi medida em um intervalo de pH de 0,5.

$$U_e = \frac{2\epsilon\zeta f(ka)}{3n} \quad (2)$$

Em que, U_e = mobilidade eletroforética, ζ = Potencial Zeta, ϵ = Constante Dielétrica, n = viscosidade e $f(ka)$ = função de Henry.

4.6.4 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

O diâmetro hidrodinâmico foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern, pela técnica de espalhamento de luz dinâmico, na qual o detector é posicionado em um ângulo de 173° em relação a luz incidente sobre a amostra, em uma temperatura de 25° C, utilizou-se água como dispersante da amostra. A técnica de espalhamento de luz dinâmico relaciona o tamanho das partículas com o movimento Browniano. O movimento Browniano refere-se à movimentação das partículas devido a colisões randômicas com as moléculas do líquido, desta

maneira, o detector registra a intensidade de luz espalhada ao incidir um feixe de laser sobre a partícula em movimento, relacionando o tamanho das partículas pela equação de Stokes-Einstein (equação 3):

$$D_h = \frac{KT}{3\pi n D} \quad (3)$$

Em que, D_h = diâmetro hidrodinâmico, D = coeficiente de difusão translacional, K = constante de Boltzmann, T = temperatura e n = viscosidade.

4.6.5 Microscopia eletrônica de varredura (FEG-MEV)

As análises de microscopia eletrônica de varredura foram realizadas em microscópio JEOL JSM 7500F. As amostras foram preparadas a partir da dispersão das nanopartículas em isopropanol, posteriormente foram gotejadas sobre substrato de silício para realização das análises.

4.6.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises de microscopia eletrônica de transmissão foram obtidas em um microscópio Philips, modelo CM120, operando a 120 kV. A amostra foi dispersa em isopropanol e uma gota da dispersão foi depositada sobre grade de cobre recoberta com carbono. A grade contendo a amostra depositada foi seca em um dessecador à vácuo por 1 dia.

4.6.7 Medidas de umidade da amostra utilizando balança de infravermelho.

O teor de água presente no biocatalisador, nas formas livre e imobilizada, foi medido diretamente em uma balança de secagem acoplada com lâmpada de infravermelho (Modelo MOC63u; Shimadzu).

4.6.8 Análise Térmica (TG/DTA)

A análise termogravimétrica das amostras foi realizada em um equipamento Netzsch STA 409/CD sob fluxo de ar seco 100 mL/min. As amostras foram aquecidas a temperatura ambiente até 1000° C a uma taxa de aquecimento de 10° C/min.

Tabela 1- Massa pesada no início do processo da análise térmica.

SP-APTS (mg)	SP-APTS-LPP (mg)	LPP livre (mg)
7,616	2,128	8,055

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese e caracterização do óxido de ferro funcionalizados com APTS

Conforme previamente discutido, na literatura existe uma diversa gama de rotas de síntese das nanopartículas superparamagnéticas de ferro. Neste trabalho foram escolhidos dois métodos: A síntese por coprecipitação para obtenção de nanopartículas magnéticas (NP) e a síntese de suportes magnéticos porosos (SP) em meio orgânico de dietilenoglicol e dietanolamina.

No método de co-precipitação, as nanopartículas foram obtidas pela adição de Fe²⁺ e Fe³⁺ em uma solução aquosa de hidróxido de sódio na proporção 1:2 respectivamente, com adição de APTS resultando em precipitados de coloração preta, entre pH 11 e 12. Após algumas semanas a suspensão coloidal apresentou coloração marrom indicando oxidação da magnetita à maghemita (γ -Fe₂O₃) pelo contato da solução com o ar.

No segundo método, a magnetita foi sintetizada em meio orgânico de dietilenoglicol e dietanolamina na proporção 1:1, com a adição de Fe²⁺ e Fe³⁺ na razão molar de 1:2, hidróxido de sódio e APTS, em sistema fechado e atmosfera de argônio por oito horas. A suspensão apresentou precipitados de coloração preta, entre pH 11 e 12 e não houve modificação de coloração durante o armazenamento.

Na figura 17 observam-se duas soluções, a de coloração marrom que são as nanopartículas sintetizadas pelo método de coprecipitação e a de coloração preta sintetizada em meio orgânico. Ambas apresentaram boa resposta ao campo magnético, sendo que as nanopartículas obtidas pelo método orgânico visualmente mostrou maior interação com o campo do imã, levando a uma separação magnética mais rápida.

Figura 17- Nanopartículas magnéticas e suportes porosos magnéticos sob efeito de campo magnético de um imã de Neodímio. a) Comportamento magnético inicial das nanopartículas e suporte magnético poroso magnéticas. b) Comportamento magnético final após dois minutos.

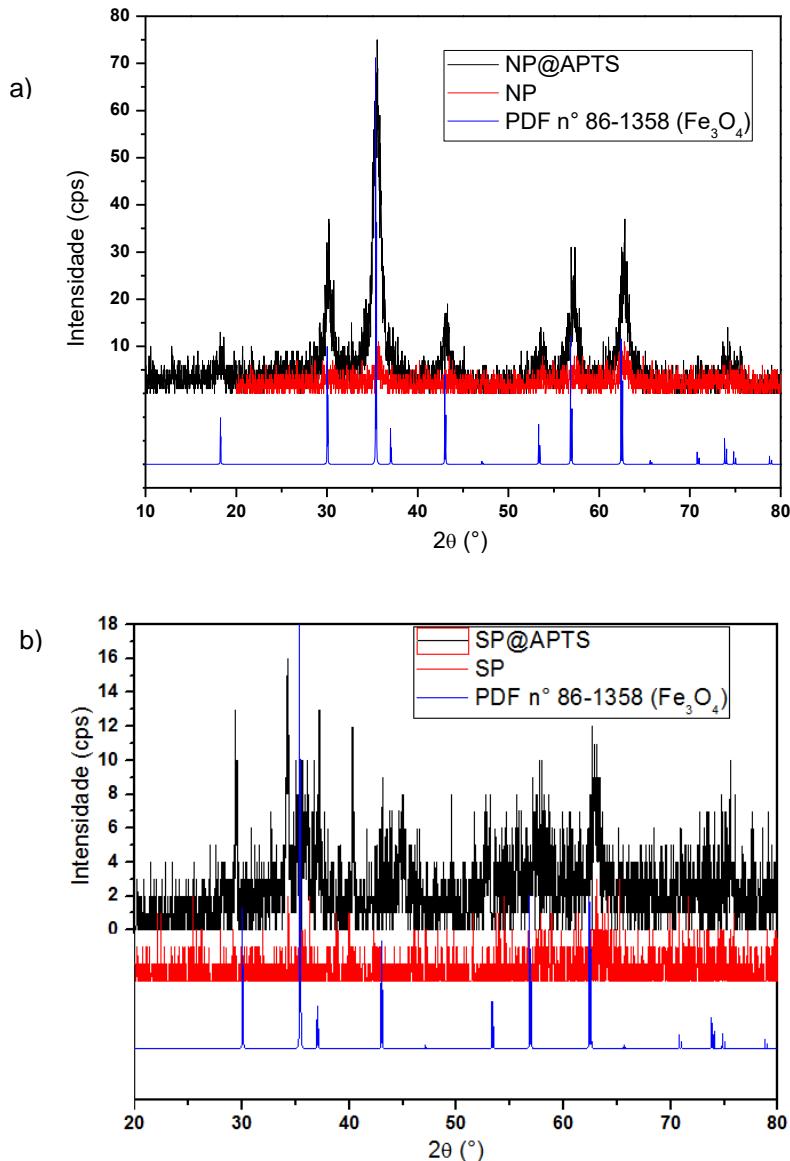


Fonte: Elaborada pela autora

A caracterização das nanopartículas magnéticas e dos suportes magnéticos porosos foi feita para verificar a formação da fase desejada, a magnetita. Nos difratogramas da figura 18, observa-se o perfil de difração de raios X das amostras obtidas pelos dois métodos citados acima. Ambos foram comparados com o padrão de difração de raios X da magnetita do banco de dados de estrutura cristalina, PDF n° 86 -138 (Fe_3O_4).

Com a análise do difratograma foi possível confirmar a formação da fase magnetita ou maghemita no difratograma de raios X, pois as estruturas cristalinas de ambas as fases apresentam picos de Bragg na mesma posição. Para determinar qual dos óxidos magnéticos esta se formando é necessário um estudo de Mossbauer. No difratograma da Figura 18a, observam-se picos de difração de raios X característicos das distâncias interplanares da fase Fe_3O_4 . Na análise da figura 18b, referente ao suporte magnético poroso, verificou-se também a presença de picos de difração característicos da fase desejada, além de picos de fases desconhecidas.

Figura 18- Difratograma de Raios X comparando o padrão magnetita a) com as nanopartículas magnéticas b) com o suporte magnético poroso.



Fonte: Elaborada pela autora

Os diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas e do suporte magnético poroso foram determinados após a execução da síntese e as amostras foram dispersas em água. Como pode ser observado na tabela 2, os diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas funcionalizadas aumentou com relação às nanopartículas magnéticas antes da funcionalização. Para os sistemas NP e NP-APTS o aumento foi proporcionalmente menor, sugerindo formação de

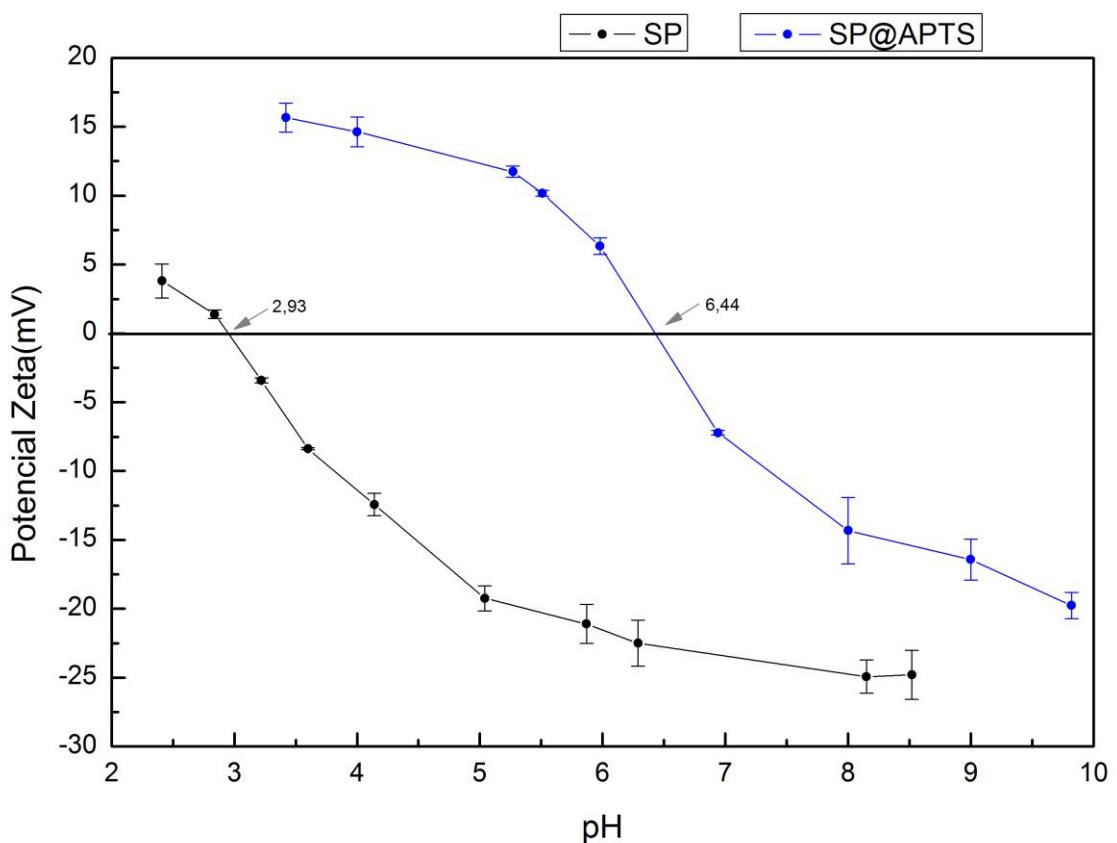
monocamadas de APTS na superfície das nanopartículas. Entretanto, para os sistemas SP e SP-APTS o aumento foi da ordem de 5 vezes maior, sugerindo que pode ter ocorrido a aglomeração do suporte poroso por intermédio da policondensação do alcoxisilano.

Tabela 2- Média do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade realizados em triplicata.

Amostra	D _h (nm)	PDI
SP	336,5	0,366
SP-APTS	1845,7	0,789
NP	189,5	0,088
NP-APTS	218,6	0,207

O potencial zeta de superfície foi medido com a finalidade de estudar a carga na superfície das nanopartículas magnéticas em função do pH e verificar se a superfície das nanopartículas foram funcionalizadas com grupos aminas na reação com o APTS. Esta análise foi realizada apenas com o suporte magnético poroso (Figura 19), uma vez que este apresentou estabilidade coloidal adequada para análise. Inicialmente SP e SP-APTS apresentaram cargas positivas devido a acidificação da suspensão com ácido clorídrico diluído até atingir pH entre 2,5 e 3,5. Após a titulação com hidróxido de sódio diluído observa-se o ponto isoeletétrico em pH 2,93 para SP e 6,44 para SP-APTS, indicando a funcionalização da superfície com grupos aminas.

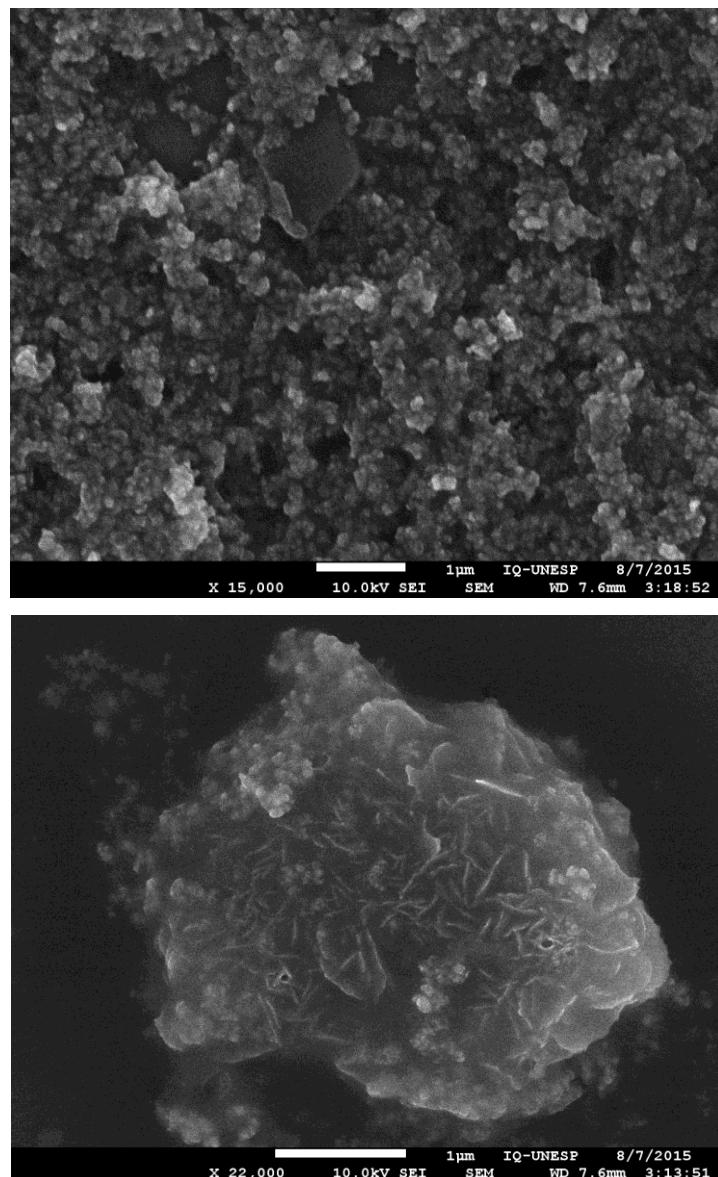
Figura 19- Potencial zeta do SP e SP-APTS.



Fonte: Elaborada pela autora

As imagens de microscopia eletrônica de varredura para as NP-APTS são apresentadas na figura 20. Observa-se a formação de agregados, com distribuição de tamanho e formas irregulares. A agregação das partículas pode ser atribuída em grande parte ao processo de secagem utilizado no preparo das amostras para as análises de MEV. É possível verificar também uma camada espessa sobre as nanopartículas indicando a presença de grupos aminas na superfície, resultado da policondensação do alcoxisilano.

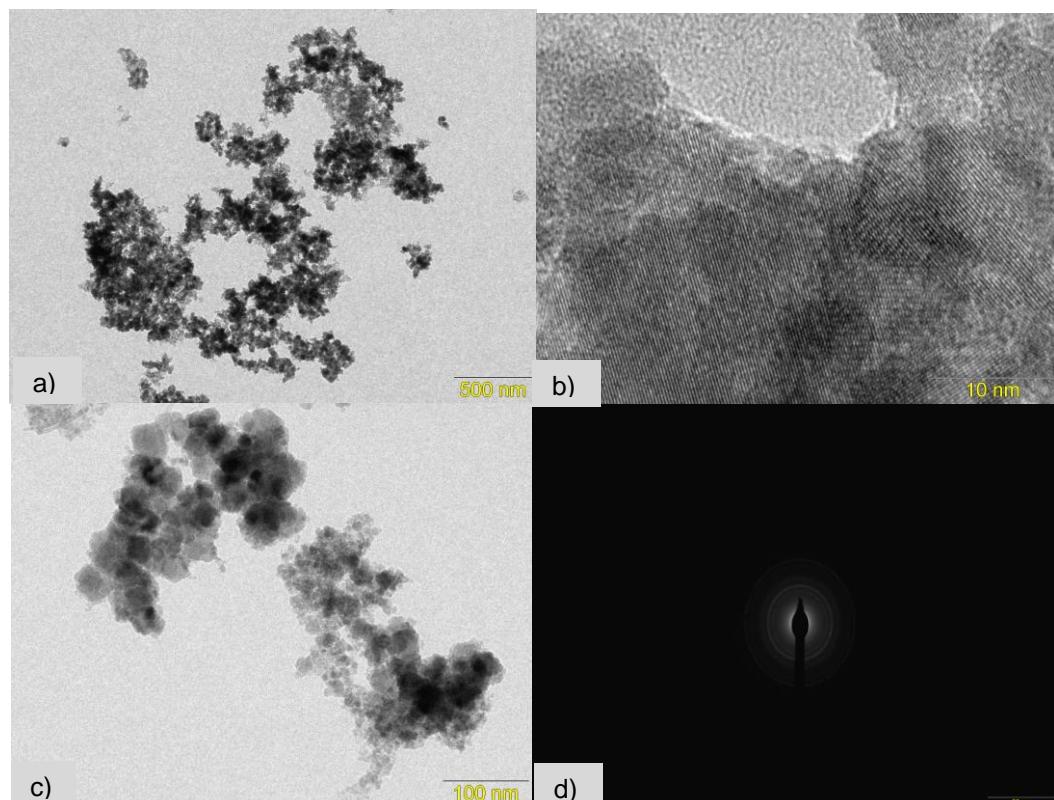
Figura 20- Imagens do MEV da NP-APTS.



Fonte: Elaborada pela autora

A síntese por coprecipitação não apresenta controle rigoroso em relação ao tamanho e forma das nanopartículas. A nucleação dos óxidos de ferro ocorre em processo rápido e é interrompida quando a solução alcança um valor crítico de saturação de base. Por este motivo as nanopartículas apresentam tamanhos pequenos e morfologia não esférica. A análise da figura 21, revela nanopartículas com forma quase esférica e a difração de elétrons indica que a amostra é cristalina.

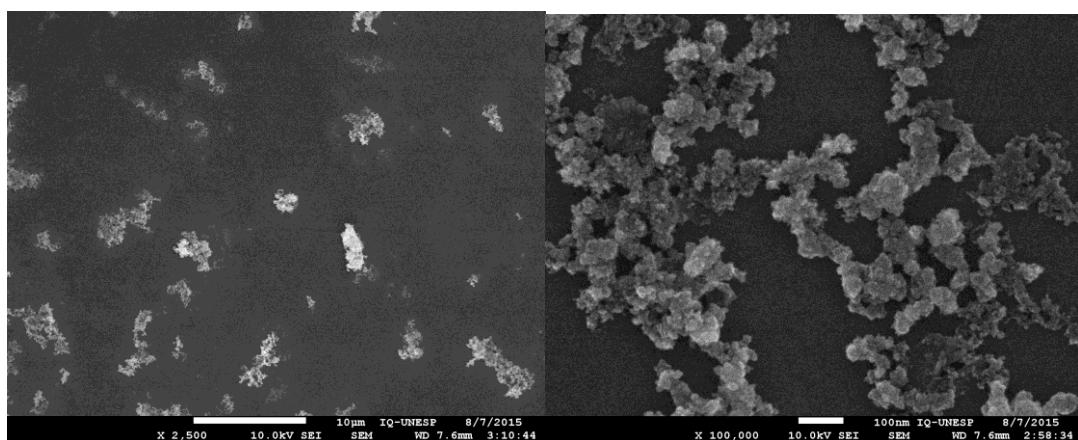
Figura 21- Imagens de TEM das nanopartículas magnéticas funcionalizadas com APTS. a) nanopartículas a 500 nm. b) planos atômicos a 10 nm. c) nanopartículas a 100 nm. d) padrão de difração.



Fonte: Elaborada pela autora

A microscopia eletrônica de varredura para os suportes porosos com APTS são apresentadas na figura 22. Na amostra observa-se a formação de agregados, com distribuição de tamanho e formas irregulares.

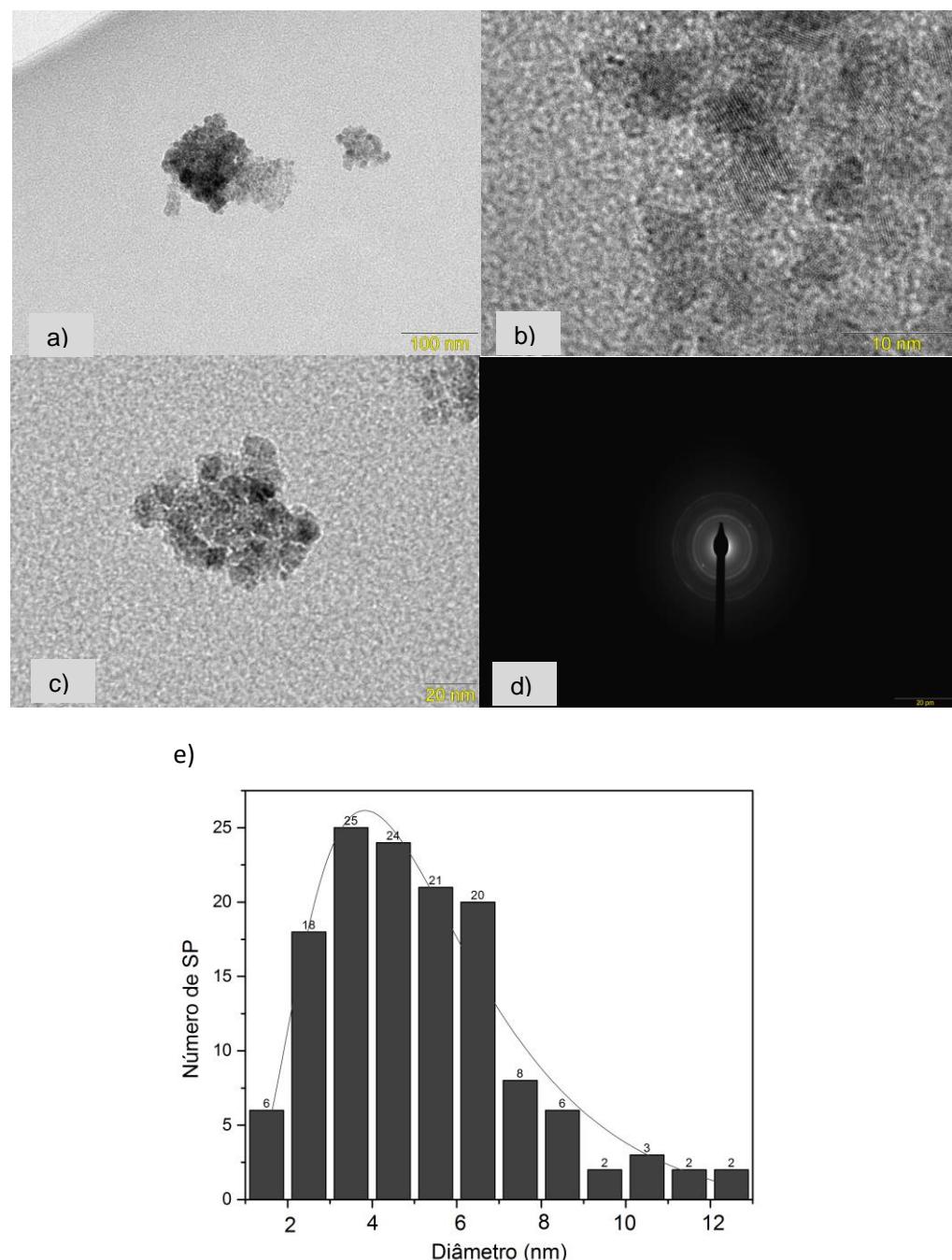
Figura 22- Imagens de MEV do suporte magnético poroso.



Fonte: Elaborada pela autora

Na figura 23 observam-se cristais pequenos de nanopartículas magnéticas com tamanhos entre 3 e 7 nm. O agregado destas nanopartículas forma o suporte magnético poroso. Os poros do suporte poroso podem ser vistos em diferentes tamanhos e estimam-se valores entre 4 e 5 nm, conforme histograma da figura 23e.

Figura 23- Imagens de MET dos suportes porosos magnéticos funcionalizados com APTS. a) suporte poroso a 100 nm. b) planos atômicos a 10 nm. c) suporte poroso a 20 nm. d) padrão de difração. e) Relação do número de SP-APTS com o diâmetro (nm).

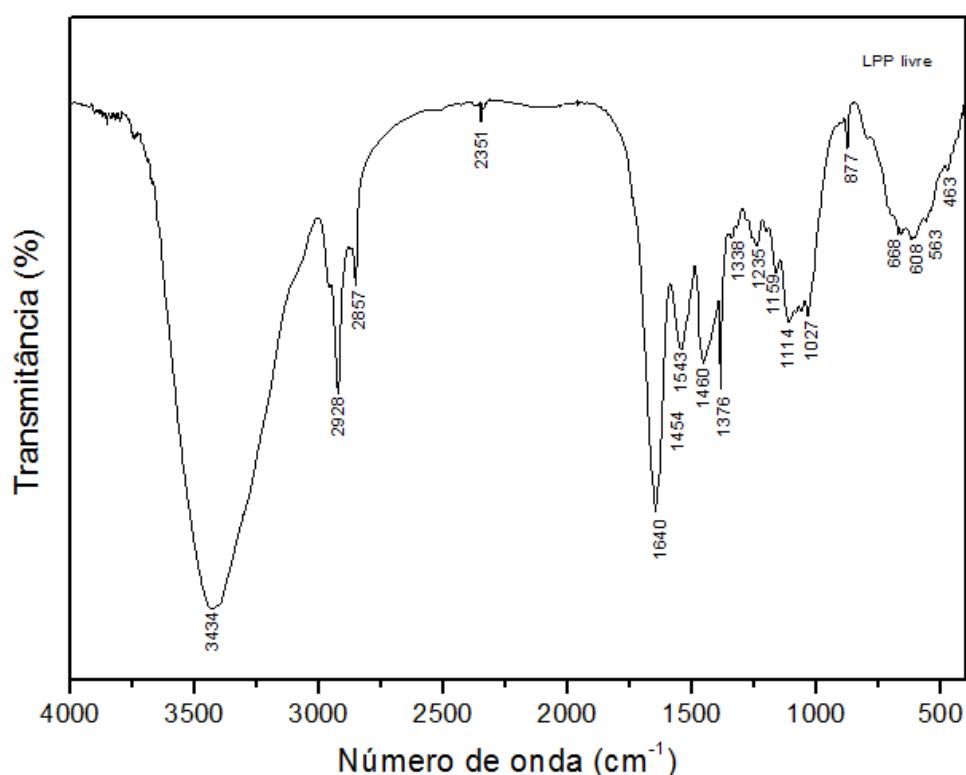


Fonte: Elaborada pela autora

5.2 Imobilização da LPP em NP-APTS e SP-APTS

O espectro de absorção na região do infravermelho para a enzima LPP é mostrado na figura 24. A banda em 3434 cm^{-1} apresenta vibrações O-H atribuída a presença de água. A vibração forte alongada C=O e amidas primárias é observada em 1646 cm^{-1} . Em $1451\text{-}1407\text{ cm}^{-1}$ são atribuídas a deformação N-H de amidas secundárias da enzima. Outras bandas importantes são: 1543 cm^{-1} (deformação NH₂), banda média 1460 cm^{-1} (deformação N-H), 1235 cm^{-1} (forma β – estrutura de folha da proteína), $1159\text{-}1027\text{ cm}^{-1}$ vibrações C-C da lipase, 877 cm^{-1} (C-N-C), 668 cm^{-1} (deformação C=O) e $608\text{-}463\text{ cm}^{-1}$ (deformação fora do plano C-O).⁵⁶

Figura 24- Espectros da região do infravermelho (FT-IR) da LPP.



Fonte: Elaborada pela autora

A figura 25 ilustra os espectros de absorção na região do infravermelho realizadas para as amostras de nanopartículas magnéticas com a LPP e sem LPP. Ambas apresentaram bandas de ligação de hidrogênio provenientes da amina primária alifática que coincidem com as bandas O-H da água em 3434 cm^{-1} e 3382

cm^{-1} , respectivamente. Para a magnetita a banda em 3389 cm^{-1} é atribuída as bandas de O-H da água.

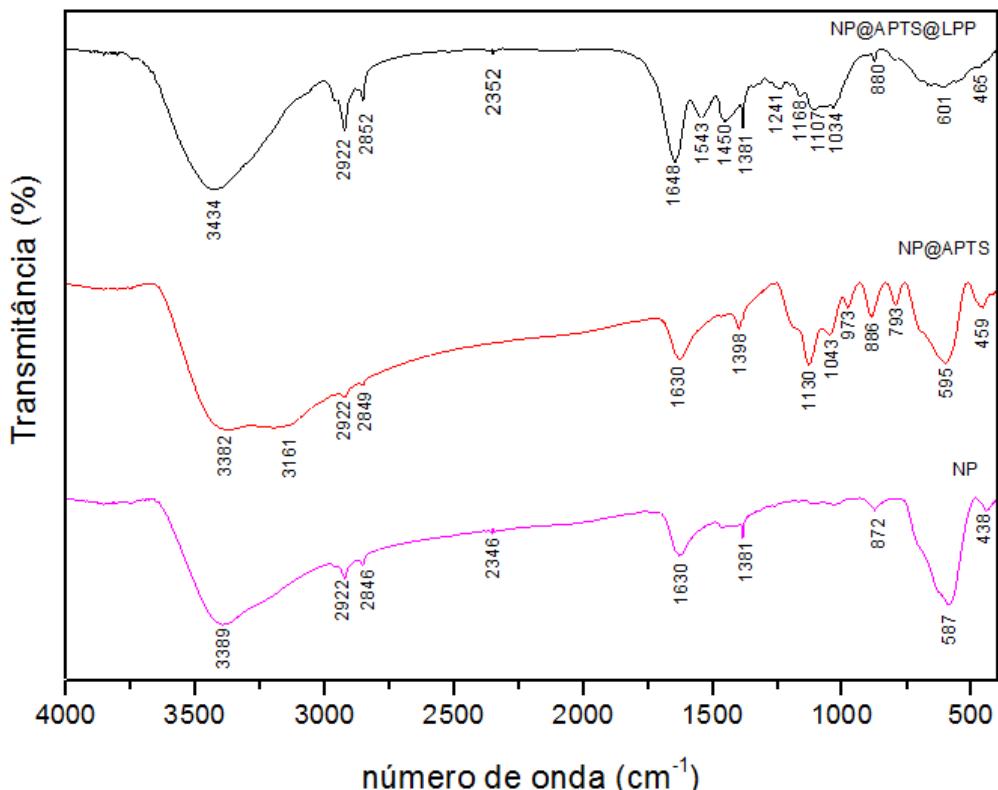
As bandas que coincidem entre os três espectros (figura 25) são: em $\sim 1630 \text{ cm}^{-1}$ provenientes das bandas O-H da água, em $\sim 1381 \text{ cm}^{-1}$ é referente as bandas de deformação símetrica C-H, e em $\sim 2346 \text{ cm}^{-1}$ atribuída ao CO_2 da atmosfera.

Em todas as amostras observaram-se bandas em 587 (forte), 438, 595, 459 e 465 cm^{-1} que são atribuídas à magnetita. Na LPP imobilizada além da banda da magnetita, observa-se em 601 cm^{-1} (Fe-O) a presença de maghemita.

A análise das bandas da NP-APTS indicou em 793 cm^{-1} amina primária alifática, 886 cm^{-1} vibração N-H fora do plano, 1043 cm^{-1} amina primária e 1130 cm^{-1} amina secundária.

No espectro infravermelho da LPP imobilizada foram observadas bandas em 1450 cm^{-1} da amida secundária (deformação N-H), 1543 cm^{-1} deformação NH_2 , 1648 cm^{-1} vibração forte alongada C=O provenientes de amidas primárias.

Figura 25- Espectros da região do infravermelho (FT-IR) das nanopartículas magnéticas.



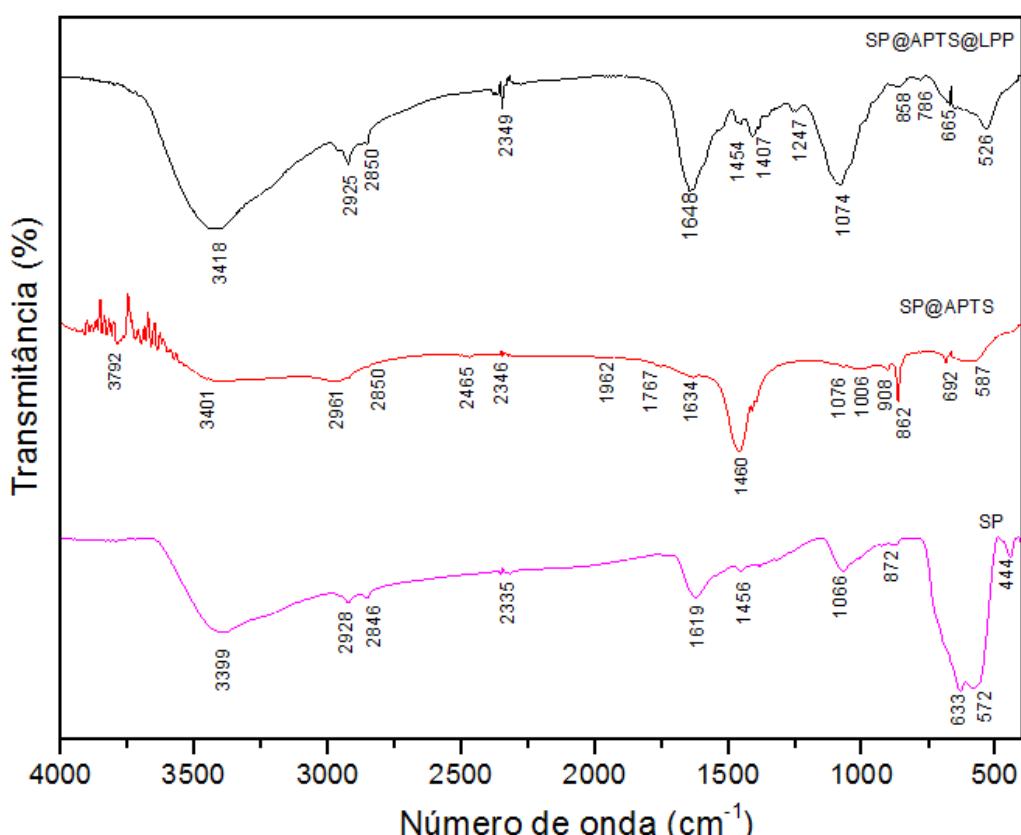
Fonte: Elaborada pela autora

O suporte magnético poroso (figura 26) apresentou bandas em 3399 cm⁻¹ e 1619 (O-H) atribuídas a água adsorvida. Em 633 cm⁻¹, 573 cm⁻¹ e 444 cm⁻¹ observam-se bandas de absorção referentes às ligações Fe-O.

Na amostra que contém suporte magnético poroso funcionalizado com APTS observa-se em 3792 cm⁻¹ distorções atribuídas a traços de solvente orgânico (DEG/DEA). A banda forte em 1460 cm⁻¹ indica a presença de aminas secundárias alifáticas (vibração N-H). Em 1076 e 1006 cm⁻¹ podem ser visualizadas bandas de vibração C-N de aminas primárias. A presença de SP se confirmou pelas bandas em 692 cm⁻¹ e em 587 cm⁻¹, atribuídas às vibrações das ligações Fe-O.

No espectro da LPP immobilizada consta banda forte em 3418 cm⁻¹ proveniente da água (O-H). A banda forte em 1648 cm⁻¹ é atribuída a vibração alongada C=O de amidas primárias. Em 1454 e 1407 cm⁻¹ se referem à amidas secundárias (deformação N-H) e a banda forte em 1074 cm⁻¹ foi atribuída à vibração C-C da enzima. A confirmação das fases maghemita e magnetita estão em 665 cm⁻¹ e 526 cm⁻¹, respectivamente.

Figura 26- Espectros da região do infravermelho (FT-IR) do suporte magnético poroso.



Fonte: Elaborada pela autora

Os diâmetros hidrodinâmicos das nanopartículas e suporte magnético poroso com e sem a LPP foram determinados após a execução da síntese e as amostras foram dispersas em água. Como pode ser observado na tabela 3, as nanopartículas com a lipase apresentam diâmetros hidrodinâmicos maiores que nas nanopartículas e suporte magnético porosos com APTS. Estes resultados confirmam a modificação da superfície das nanopartículas magnéticas e dos suportes porosos magnéticos com enzimas.

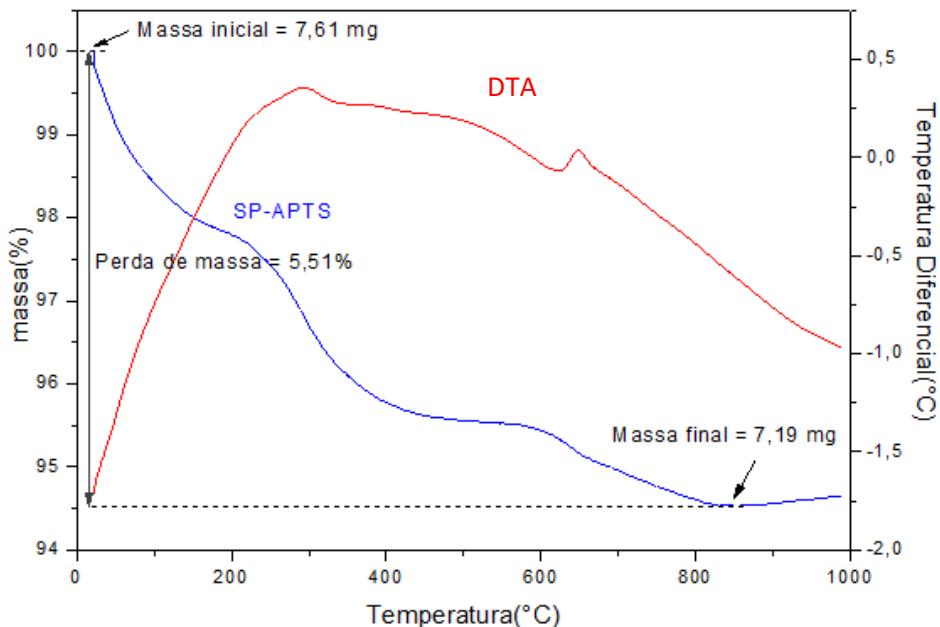
Tabela 3- Média do diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersidade realizado em triplicata.

Amostra	D _h (nm)	PDI
SP-APTS	1845,7	0,789
NP-APTS-LPP	3159,7	0,390
NP-APTS	218,6	0,207
NP-APTS-LPP	2408,3	1,000
LPP livre	876,4	0,634

A análise térmica foi utilizada para determinação da quantidade de enzima que efetivamente se ligou aos suportes magnéticos porosos. Desta forma, foi possível analisar a atividade enzimática real da LPP imobilizada comparada com a LPP livre.

Nas curvas TG/DTA dos suportes porosos funcionalizados com APTS (figura 27) observou-se perda de massa de apenas 5,51%, variando-se a temperatura de 25°C a 1000°C. Este resultado indica que os grupos orgânicos da superfície provenientes do alcoxisilano são decompostos liberando H₂O, CO₂ e N₂, permanecendo apenas o óxido de silício e o óxido de ferro.

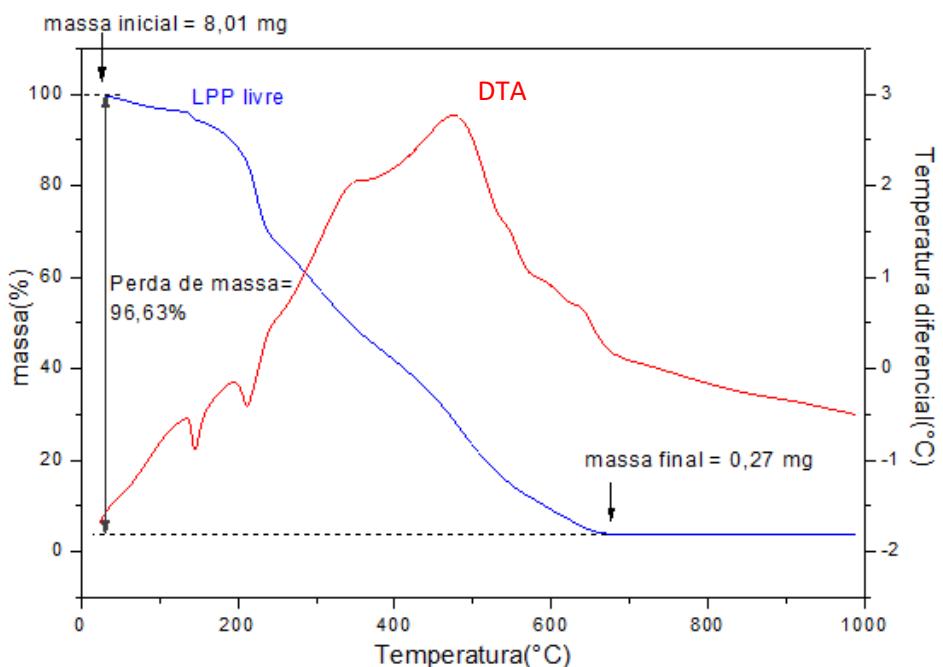
Figura 27- Curvas TG/DTA obtidas para a SP-APTS.



Fonte: Elaborada pela autora

Na análise térmica da LPP livre da figura 28 observou-se perda de massa de 96,63%, sendo que 0,27 mg representa 3,37 % da massa inicial (8,01 mg). A cadeia de aminoácidos da enzima foi completamente degradada após 650° C.

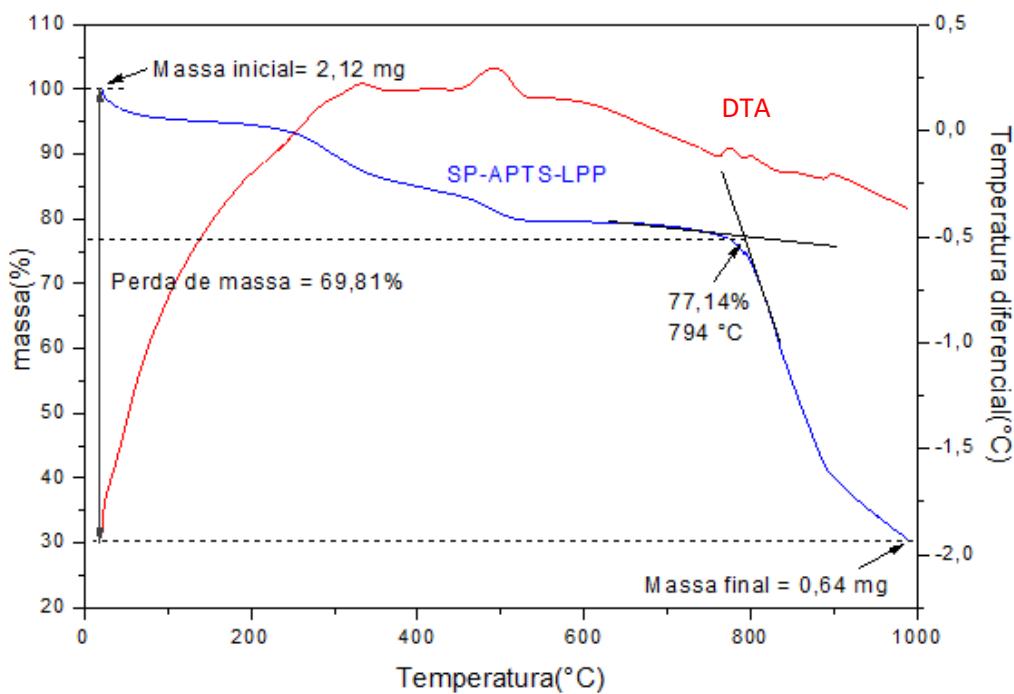
Figura 28- Curvas TG/DTA obtidas para a lipase de pâncreas de porco (livre).



Fonte: Elaborada pela autora.

A figura 29 ilustra o comportamento térmico da amostra NP-APTS-LPP. Observa-se que a perda de massa entre 600 e 800°C presente na amostra NP-APTS (figura 27) agora ocorreu acentuadamente após 794°C (figura 29). Este resultado sugere que a interação da enzima com o suporte magnético poroso funcionalizado com APTS tornou a enzima mais resistente ao aumento de temperatura ou decomposição de materiais gasosos que ficaram aprisionados nos poros. De acordo com a figura 28, as perdas de massa da LPP ocorrem até a temperatura de 650 °C. No entanto, a figura 29 observou-se que a perda total de massa da amostra foi de 69,81%. A massa restante (óxido de ferro e óxido de silício) de 0,64 mg representa 30,19% da quantidade da massa inicial. As perdas de massas até 794 °C representam a porcentagem de enzima imobilizada. Por meio de tratamento matemático, o cruzamento das retas tangentes à curva TG fornecem o valor de 22,86 % do valor inicial, que podem ser atribuídas à lipase na superfície do suporte poroso. Este resultado permite inferir sobre o rendimento de imobilização e correlacionar com as atividades observadas para a enzima livre e imobilizada, conforme será discutido a seguir.

Figura 29- Curvas TG/DTA obtidas para a lipase de pâncreas de porco imobilizada com SP-APTS.



Fonte: Elaborada pela autora

5.3 Atividade hidrolítica da LPP imobilizada com nanopartículas e suporte magnético porosos magnéticas

A determinação da atividade hidrolítica foi realizada utilizando emulsão de azeite de oliva, água e tampão fosfato (pH 8,0; 0,1M), a 37° C. Na tabela 4, são apresentados os valores de atividade de cada um dos derivados imobilizados obtidos, bem como da LPP na forma livre.

Tabela 4- Atividade Enzimática das imobilizações com NP-APTS, SP-APTS e LPP livre.

Amostra	Atividade (U/g)
NP-APTS-LPP	432,2 ± 83,32
SP-APTS-LPP	559,5 ± 0,00
LPP livre	7196,5 ± 0,00

Os resultados revelaram que o suporte SP-APTS forneceu derivados imobilizados com maior valor de atividade hidrolítica. Isso porque, o suporte SP-APTS facilita a formação de aglomerados, levando à obtenção de maior área superficial, em comparação ao suporte NP-APTS. Portanto, mais grupos funcionais $-NH_2$ estarão disponíveis para ligação cruzada com a molécula de enzima (lipase). Apesar do valor de atividade da enzima livre ser maior do que o fornecido pela enzima imobilizada, deve-se levar em consideração a quantidade efetiva de enzima presente em 50 mg de SP-APTS-LPP utilizados (massa de nanopartícula + massa de lipase). A partir dos dados de análise térmica (figura 27, 28, 29), foi possível verificar que apenas 22,86% da massa inicial deve ser atribuída a enzima suportada nas nanopartículas magnéticas. Desta forma, o resultado de atividade para a amostra SP-APTS-LPP corresponde a uma massa de 11,43 mg de enzima, enquanto a atividade da enzima livre corresponde a uma massa de 50 mg. Considerando a atividade por mg de enzima, e normatizando para a massa de 11,43 mg de enzima nos suportes magnéticos, observa-se que a enzima em SP-APTS apresentou uma atividade de 559,5 U/g, enquanto a enzima livre nesta mesma massa apresenta atividade de 1645 U/g.

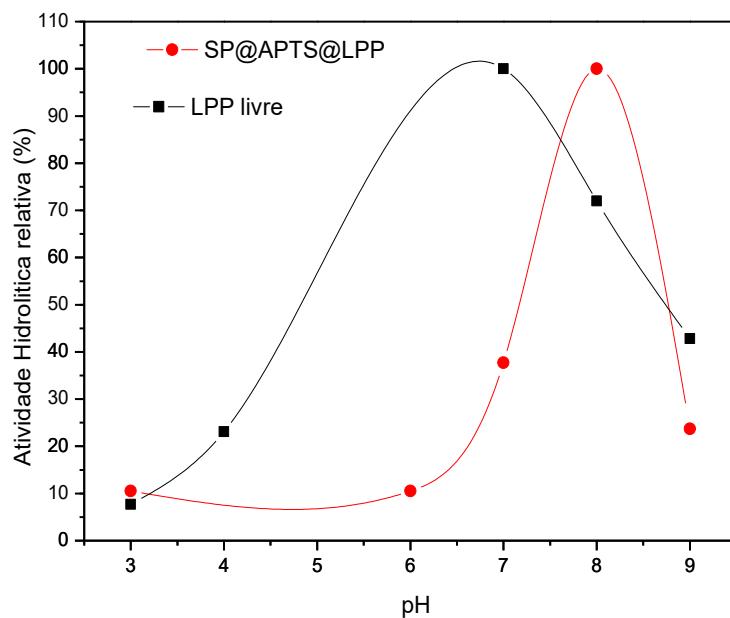
Portanto, apesar do fato do derivado imobilizado ter apresentado menor valor de atividade hidrolítica, em relação à lipase livre, deve-se salientar as vantagens do uso da enzima imobilizada no suporte magnético, as quais estão relacionadas à possibilidade de reuso do biocatalisador. Além disso, os resultados de análise térmica sugerem um ganho em resistência térmica as enzimas suportadas, o que pode agregar a possibilidade de aplicar estas enzimas em processos biocatalíticos que necessitem maiores temperaturas para obter melhores rendimentos.

Com base nestes resultados, para a continuidade do trabalho, selecionou-se o suporte SP-APTS-LPP, uma vez que este forneceu maiores valores de atividade hidrolítica. A proxima etapa foi a avaliação da temperatura e do pH ótimo do derivado imobilizado. Foram avaliadas diferentes temperaturas (40, 45, 50, 55, 60 °C), bem como diferentes pHs (3-9). Os resultados são apresentados a seguir, em comparação aos valores obtidos para a LPP na forma livre.

A Figura 30, apresenta os valores de atividade relativa (%) da lipase de pâncreas de porco livre e imobilizada SP-APTS-LPP em função do pH. Estes experimentos foram realizadas na temperatura fixa de 37 °C. Os resultados revelaram que o processo de imobilização promoveu um deslocamento no valor de pH ótimo da enzima na forma livre. A LPP livre apresentou pH ótimo de 6,5, enquanto o derivado imobilizado SP-APTS-LPP forneceu um valor ótimo de pH em 8,0. Este resultado representa uma vantagem de aplicação do biocatalisador em processos que ocorrem em meio básico.

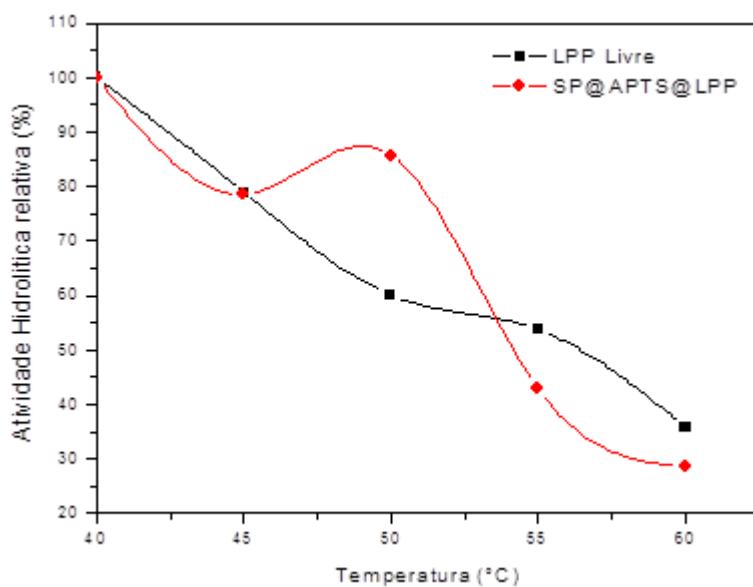
A Figura 31, apresenta os valores de atividade relativa (%) da lipase de pâncreas de porco livre e imobilizada SP-APTS-LPP em função da temperatura (°C). Estes experimentos foram realizados no pH ótimo previamente determinado (pH 8).⁵⁷ Pode-se observar que o processo de imobilização não promoveu alteração no valor de temperatura ótima da enzima (40°C). Porém, os resultados mostraram que a LPP imobilizada apresentou maior valor de atividade a 50°C, em comparação à LPP na forma livre. Este resultado representa uma vantagem de aplicação do biocatalisador em processos que necessitam de maiores temperaturas, como por exemplo, a síntese de biodiesel. Em temperaturas superiores a 50°C, este comportamento não pôde ser observado.

Figura 30- Atividade hidrolítica relativa (%) da LPP livre e SP-APTS-LPP em função do pH.



Fonte: Elaborada pela autora.

Figura 31- Atividade hidrolítica relativa (%) da LPP livre e SP-APTS-LPP em função da temperatura.



Fonte: Elaborada pela autora.

Quando se tratam de biocatalisadores, além da determinação da temperatura e do pH ótimo, devem ser avaliados os parâmetros cinéticos K_m e $V_{máx}$, a estabilidade ao pH, à temperatura, bem como o reuso do biocatalisador. Estes estudos fornecem informações importantes sobre o derivado imobilizado. No entanto, salienta-se que o objetivo do presente trabalho foi sintetizar nanopartículas magnéticas visando à imobilização de enzimas e não a caracterização do derivado imobilizado obtido. Portanto, os resultados apresentados mostram o potencial do suporte SP-APTS em aplicações na área de biocatálise. Estudos complementares devem ser efetuados visando à maior caracterização das propriedades catalíticas do derivado imobilizado.

6 CONCLUSÕES

As nanopartículas magnéticas e o suporte magnético porosos foram obtidos a partir da coprecipitação e síntese em meio orgânico de dietanolamina e dietilenoglicol.

As técnicas de microscopia utilizadas (MEV e MET) permitiram averiguar a morfologia dos sistemas obtidos. A formação de agregados de suporte magnético poroso possui nanopartículas individuais com diâmetros entre 3 e 7 nm. Ambas NP-APTS e SP-APTS apresentaram nanopartículas sem forma definida, próxima a esferas e tamanhos diversos.

O potencial zeta confirmou a funcionalização do suporte magnético poroso com o APTS, apresentando grupos aminas na superfície.

A medida de diâmetro por DLS, se mostrou satisfatória para nanopartículas e suporte magnético poroso funcionalizadas com APTS, sendo comprovado o recobrimento da superfície. Em amostras que continham a LPP, houve aumento do raio hidrodinâmico, indicando o sucesso da imobilização da enzima na superfície das nanopartículas magnéticas.

Os espectros de infravermelho confirmaram a funcionalização com os grupos orgânicos para ambas (NP, SP) e a imobilização da LPP foi constatada por apresentar bandas de amidas provenientes das enzimas.

Pela análise térmica pode-se quantificar a quantidade de LPP que efetivamente se ligou ao suporte magnético.

A atividade enzimática apresentou bons resultados e a imobilização foi realizada com sucesso. A LPP imobilizada apresentou maior valor de atividade a 50°C, em comparação à LPP na forma livre. Este resultado representa uma vantagem de aplicação do biocatalisador em processos que necessitam de maiores temperaturas, como por exemplo, a síntese de biodiesel.

A LPP livre apresentou pH ótimo de 6,5, enquanto o derivado imobilizado NP-APTS-LPP forneceu um valor ótimo de pH em 8,0. Este resultado representa uma vantagem de aplicação do biocatalisador em processos que ocorrem em meio básico.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Avaliação do uso de detergentes no processo de imobilização, visando a exposição do sítio ativo da lipase;
- Avaliação da concentração de glutaraldeído e do carregamento de enzima no processo de imobilização, visando aumentar o rendimento de imobilização;
- Caracterização do derivado imobilizado em relação às propriedades cinéticas e de estabilidade operacional;
- Aplicação do derivado imobilizado em reações de transesterificação visando a síntese de biodiesel.

REFERÊNCIAS

- 1 HANEFELD, U.; CAOB, L.; MAGNER, E. Enzyme immobilization: fundamentals and application. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6211-6212, 2013.
- 2 VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 9, p. 113-148, 2003.
- 3 PESSELA, B. C. C.; DELLAMORA-ORTIZ, G.; BETANCOR, L.; FUENTES, M.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: from traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Enzyme Microb. Technol.**, v. 40, p. 310-315, 2007.
- 4 KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chem. Eng. Sci.**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.
- 5 MITCHELL, D. T.; LEE, S. B.; TROFIN, L.; LI, N.; NEVANEN, T. K.; SODERLUND, H.; MARTIN, C. Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 124, p. 11864-11865, 2002.
- 6 GRANMAYEH, R. D.; HAMED, A.; MOHAMMAD, H. A. Gold nanoparticles: synthesizing, characterizing and reviewing novel application in recent years. **Phys. Procedia**, v. 22, p. 203-208, 2011.
- 7 ANDREESCU, S.; NJAGI, J. C.; EROKHIN, V.; RAM, M. K.; YAVUZ O. Nanostructured materials for enzyme immobilization and biosensors. In: EROKHIN, V.; RAM, M. K.; YAVUZ, O. (Ed.). **The new frontiers of organic and composite nanotechnology**. Amsterdam: Elsevier, 2008. Chap. 7, p. 355-386.
- 8 YANG, H.; ZHANG, S.; CHEN, X.; ZHUANG, Z.; XU, J.; WANG, X. Magnetite-containing spherical silica nanoparticles for biocatalysis and bioseparations. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 1316-1321, 2004.
- 9 JAGANATHAN, H.; GODIN, B. Biocompatibility assessment of Si-based nano- and micro-particles. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 64, p. 1800-1819, 2012.
- 10 GILL, I.; BALLESTEROS, A. Encapsulation of biologicals within silicate, siloxane, and hydrid sol-gel polymers: an efficient and generic approach. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 120, p. 8587-8598, 1998.
- 11 HARTMANN, M.; KOSTROV, X. Immobilization of enzymes on porous silica: benefits and challenges. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6277-6289, 2013.
- 12 CESAR, M.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability, and selectivity via immobilization techniques. **Enz. Microb. Technol.**, v. 40, n. 6, p. 1451-1463, 2007.

- 13 QIU, G. M.; ZHU, B. K.; XU, Y. Y. Alpha-amylase immobilized by Fe₃O₄ poly (styrene-co-maleic anhydride) magnetic composite microspheres: preparation and characterization. **J. Appl. Polym. Sci.**, v. 95, p. 328-335, 2005.
- 14 BETANCOR, L.; FUENTES, M.; DELAMORA-ORTIZ, G.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; HIDALGO, A.; ALONSO-MORALES, N.; MATEO, C.; GUÍSAN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Dextran aldehyde coating of glucose oxidase immobilized on magnetic nanoparticles prevents its inactivation by gas bubbles. **J. Mol. Catal B: Enzym.**, v. 32, p. 97-101, 2005.
- 15 NELSON, L. A.; FOGLIA, T. A.; MARMER, W. N. Lipase-catalyzed production of biodiesel. **J. Am. Oil Chem. Soc.**, v. 73, p. 1191-1195, 1996.
- 16 AL-ZUHAIR, S. Production of biodiesel by lipase-catalyzed transesterification of vegetable oils: a kinetics study. **Biotechnol. Prog.**, v. 21, p. 1442-1448, 2005.
- 17 JAEGER, K.; DIJKSTRA, B. W.; REETZ, M. T. Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. 53, p. 315-351, 1999.
- 18 SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C. Applications of lipases in modifications of food lipids. In: HOU, C. (Ed.). **Handbook of industrial biocatalysis**. Boca Raton: CRC Press, 2005. p. 1-39.
- 19 KADEMI, A.; LEE, B.; HOODE, A. Production of heterologous microbial lipases by yeasts. **Ind. J. Biotechnol.**, v. 2, p. 346-355, 2003.
- 20 BRADY, L.; BRZOZOWSKI, A. M.; DEREWENDA, Z. S.; DODSON, E.; DODSON, G.; TOLLEY, S.; TURKENBURG, J. P.; CHRISTIANSEN, L.; HUGE-JENSEN, B.; THIM, L. N. L.; MENGE, U. A serine protease triad forms the catalytic center of a triacylglycerollipase. **Nature**, v. 343, p. 767-770, 1990.
- 21 PALOMO, J. M.; FUENTES, M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; GUÍSAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. **Biomacromolecules**, v. 4, n.1,p. 1-6, 2003.
- 22 FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; ARMISEN, P.; SABUQUILLO, P.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUÍSAN, J. M. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chem. Phys. Lipids**, v. 93, p. 185-197, 1998.
- 23 REETZ, M. T. Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. **Adv. Mater.**, v. 9, p. 943-954, 1997.
- 24 LÓPEZ-SERRANO, P.; CAO, L.; VAN RANTWIJK F.; SHELDON, R. A. Cross-linked enzyme aggregates with enhanced activity: application to lipases. **Biotechnol. Lett.**, v. 24, p. 1379-1383, 2002.

- 25 FERNANDEZ-LORENTE, G.; PALOMO, J. M.; MATEO, C.; MUNILLA, R.; ORTIZ, C.; CABRERA, Z.; GUISÁN, J. M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Glutaraldehyde crosslinking in the presence of detergents of lipases adsorbed on aminated supports: improving lipases performance. **Biomacromolecules**, v. 7, p. 2610-2615, 2006.
- 26 SAXENA, R.; GHOSH, P.; GUPTA, R.; DAVIDSON, W. S.; BRADOO, S.; GULATI, R. Microbial lipases: potential biocatalysts for the future industry. **Curr. Sci.**, v. 77, p. 101-115, 1999.
- 27 GARCIA-ALLES, L.; GOTOR, V. Lipase-catalyzed transesterification in organic media: solvent effects on equilibrium and individual rate constants. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 59, p. 684-694, 1998.
- 28 FJERBAEK, L.; CHRISTENSEN, K. V.; NORDDAHL, B. A review of the current state of biodiesel production using enzymatic transesterification. **Biotechnol. Bioeng.**, v. 102, p. 1298-1315, 2009.
- 29 LEW, P. C.; HEMANATHAN, K.; VASUDEO, P. Z. Enzymatic biodiesel: challenges and opportunities. **Appl. Energy**, v. 119, p. 497-520, 2014.
- 30 FANGRUI, M.; MILFORD, A. H. Biodiesel production: a review. **Bioresour. Technol.**, v. 70, p. 1-5, 1999.
- 31 LIU, K. K. M.; BARROWS, F. T.; HARDY, R. W.; DONG, F. M. Body composition, growth performance, and product quality of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) fed diets containing poultry fat, soybean/corn lecithin, or menhaden oil. **Aquaculture**, v. 238, p. 309-328, 2004.
- 32 ABREU, F. R.; LIMA, D. G.; HAMÚ, E. H.; WOLF, C.; SUAREZ, P. A. Z. Utilization of metal complexes as catalysts in the transesterification of brazilian vegetable oils with different alcohols. **J. Mol. Catal. A: Chem.**, v. 209, p. 29-33, 2004.
- 33 SANTOS, F. F. P.; MALVEIRA, J. Q.; CRUZ, M. G. A.; FERNANDES, F. A. N. Production of biodiesel by ultrasound assisted esterification of *Oreochromis niloticus* oil. **Fuel J.**, v. 89, p. 275-279, 2010.
- 34 SARAF, S.; THOMAS, B. Influence of feedstock and process chemistry on biodiesel quality. **Process Saf. Environ. Prot.**, v. 85, p. 360-364, 2007.
- 35 GOODRUM, J. W.; GELLER, D. P.; ADAMS, T. T. Rheological characterization of animal fats and their mixtures with fuel oil. **Biomass Bioenergy**, v. 24, p. 249-256, 2003.
- 36 DENNIS, Y. C. L.; XUAN, W.; LEUNG, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Appl. Energy**, v. 87, p. 1083-1095, 2010.
- 37 ISSARIYAKUL, T.; KULKARNI, M. G.; MEHER, L. C.; DALAI, A. K.; BAKHSHI, N. N. Biodiesel production from mixtures of canola oil and used cooking oil. **Chem. Eng.**, v. 140, p. 77-85, 2008.

- 38 VAN GERPEN, J.; SHANKS, B.; PRUSZKO, R.; CLEMENTS, D.; KNOTHE, G. **Biodiesel production technology**: august 2012-january 2004. Golden: National Renewable Energy Laboratory, 2004.
- 39 SORIANO, N. U. Jr.; VENDITTI, R.; ARGYROPOULOS, D. S. Biodiesel synthesis via homogeneous Lewis acid-catalyzed transesterification. **Fuel J.**, v. 88, p. 560-565, 2009.
- 40 HUANG, S. H.; LIAO, M. H.; CHEN, D. H. Direct binding and characterization of lipase onto magnetic nanoparticles. **Biotechnol. Prog.**, v. 19, n. 3, p. 1095-1100, 2003.
- 41 GUO, Z.; SUN, Y. Characteristics of immobilized lipase on hydrophobic superparamagnetic microspheres to catalyze esterification. **Biotechnol. Prog.**, v. 20, n. 2, p. 500-506, 2004.
- 42 SHELDON, R. A.; PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis: why, what and how. **Chem. Soc. Rev.**, v. 42, p. 6223-6235, 2013.
- 43 KIM, J.; GRATE, J. W.; WANG, P. Nanostructures for enzyme stabilization. **Chem. Eng. Sci.**, v. 61, p. 1017-1026, 2006.
- 44 GOSSUIN, Y.; GILLIS, P.; HOCQ, A.; VUONG, Q. L.; ROCH, A. Magnetic resonance relaxation properties of superparamagnetic particles. **Adv. Rev.**, v. 1, n. 3, p. 299-310, 2009.
- 45 ZHIYA, M.; YUEPING, G.; HUIZHOU, L. Superparamagnetic silica nanoparticles with immobilized metal affinity ligands for protein adsorption. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 301, p. 469-477, 2006.
- 46 CUI, Y.; LI, Y.; YANG, Y.; LIU, X.; LEI, L.; ZHOU, L.; PAN, F. Facile synthesis of amino-silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles and application for lipase immobilization. **J. Biotechol.**, v. 150, p. 171-174, 2010.
- 47 DENG, J.; PENG, Y.; HE, C.; LONG, X.; LI, P.; CHAN, A. S. C. Magnetic and conducting Fe₃O₄-polypyrrole nanoparticles with core-shell structure. **Polym. Int.**, v. 52, p. 1182-1187, 2003.
- 48 LI, D.; TEOH, W. Y.; GOODING, J. J.; SELOMULYA, C.; AMAL, R. Functionalization strategies for protease immobilization on magnetic nanoparticles. **Adv. Funct. Mat.**, v. 20, n. 11, p. 1767-1777, 2010.
- 49 KIM, M. I.; HAM, S. D.; OH, H. G.; PARK, H. N.; CHANG, S. H. Immobilization of *Mucor javanicus* lipase on effectively functionalized silica nanoparticles. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 39, p. 62-68, 2006.
- 50 ALONSO, N.; LÓPEZ-GALLEGO, F.; BETANCOR, L.; HIDALGO, A.; MATEO, C.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Immobilization and stabilization of glutaryl acylase on aminated separeads supports by the glutaraldehyde crosslinking method. **J. Mol. Catal. B: Enzym.**, v. 35, p. 57-61, 2005.

- 51 CIPOLATTI, E. P.; SILVA, M. J. A.; KLEIN, M.; FEDDERN, V.; FELTES, M. M. C.; OLIVEIRA, J. V.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. Current status and trends in enzymatic immobilization. **J. Mol. Cat. B: Enzym.**, v. 99, p. 56-57, 2014.
- 52 WEN, M. L.; LI, Q.; LI, J. Magnetic, electronic and structural properties of $Zn_xFe_{3-x}O_4$. **Electron Spectrosc. Relat. Phenom.**, v. 153, p. 65-70, 2006.
- 53 SHENGPING, G.; CHANGYU, W.; HUI, J.; DONGHUA, C.; QIWEI, L.; XIAOLI, L.; XUEMEI, W. Size-controlled porous superparamagnetic $Zn_{1/3}Fe_{8/3}O_4$ nanospheres: synthesis, properties and application for drug delivery. **RSC Adv.**, v. 4, p. 20841-20846, 2014.
- 54 MENG, X.; GANG, X.; ZOU, Q.-L.; WU, J.-P.; YANG, J.-P. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilised on nano-sized magnetite particles. **Food Chem.**, v. 143, p. 319-324, 2014.
- 55 PAULA, A. V. **Reestruturação da gordura de leite por interesterificação enzimática empregando lipase imobilizada**: otimização das condições reacionais e operacionais. 2011. 212 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.
- 56 BARBOSA, L. C. A. **Espectroscopia no infravermelho na caracterização de compostos orgânicos**. Viçosa: Ed. UFV, 2007.
- 57 PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane–polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Chem. Technol. Biotechnol.**, v. 82, p. 281-288, 2007.