

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.

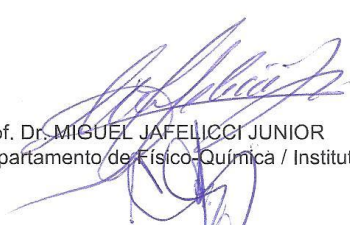
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

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

AUTOR: GABRIEL CARDOSO PINTO

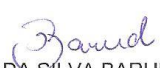
ORIENTADOR: MIGUEL JAFELICCI JUNIOR

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

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTES	3-aminopropiltrietoxisilano
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 aminopropiltrietoxisilano
OGM@APTES@LAN	Lipase de <i>Aspergillus niger</i> imobilizada em óxido de grafeno magnético funcionalizado com 3 aminopropiltrietoxisilano
OGM@APTES@LCR	Lipase de <i>Cândida rugosa</i> imobilizada em óxido de grafeno magnético funcionalizado com 3 aminopropiltrietoxisilano
OGM@APTES@LPP	Lipase pancreática suína imobilizada em óxido de grafeno magnético funcionalizado com 3 aminopropiltrietoxisilano
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

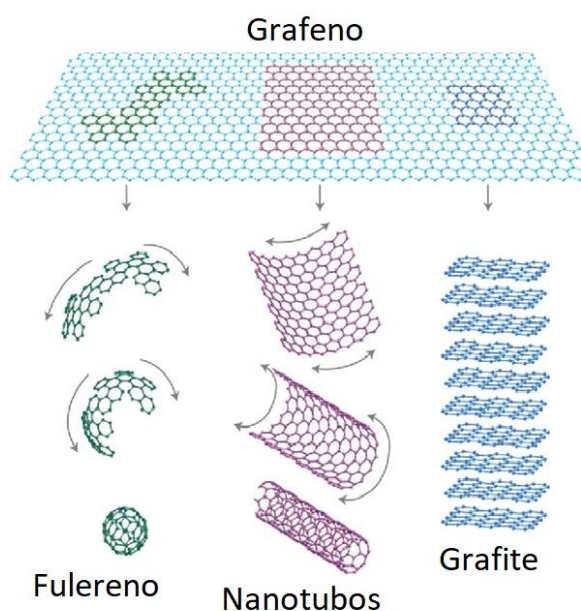
1. INTRODUÇÃO

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.

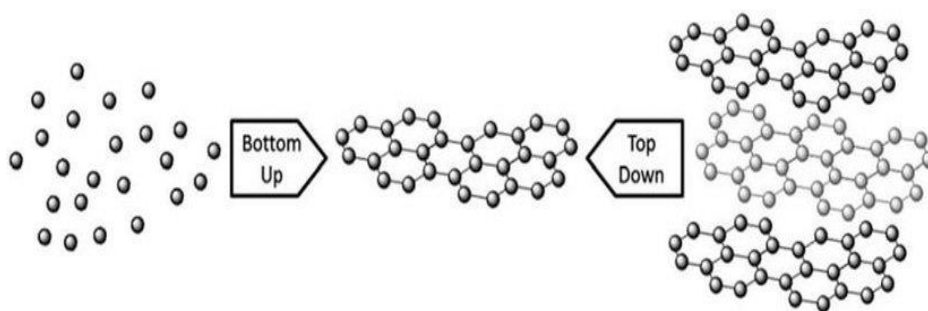


Fonte: Adaptado de Zhang *et al*, 2012 ⁵.

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.

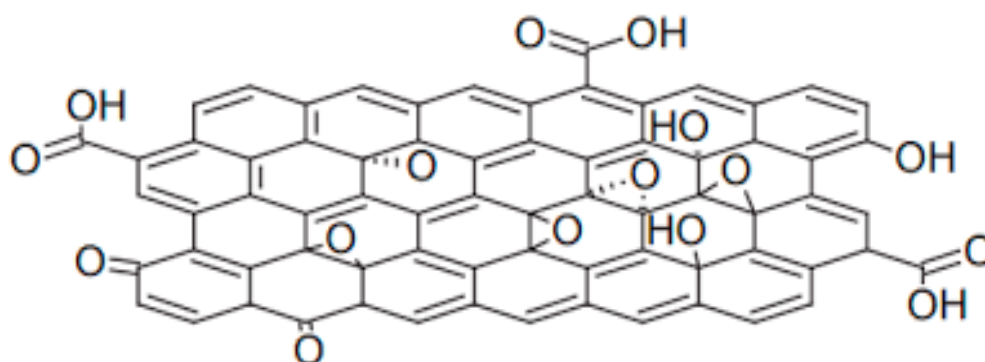
1.2 Óxido de grafeno

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.



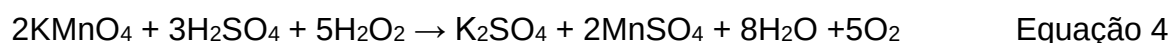
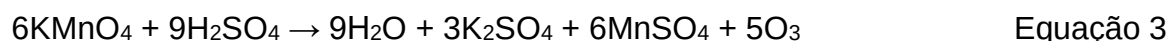
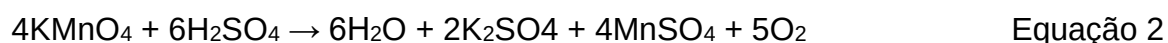
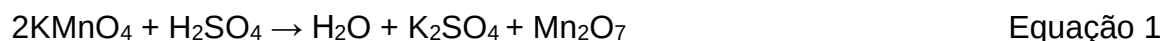
Fonte: Adaptado do modelo Hofmann¹⁷.

Dos métodos para obtenção de um composto grafítico oxidado através de um agente oxidante forte, os mais antigos são os métodos Brodie (1859) e Staudenmaier (1898), ambos utilizando clorato de potássio (KClO_3) e ácido nítrico (HNO_3). 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 (KMnO_4), juntamente com ácido sulfúrico e/ou nitrato de sódio (H_2SO_4 , NaNO_3). 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 gráfica 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.

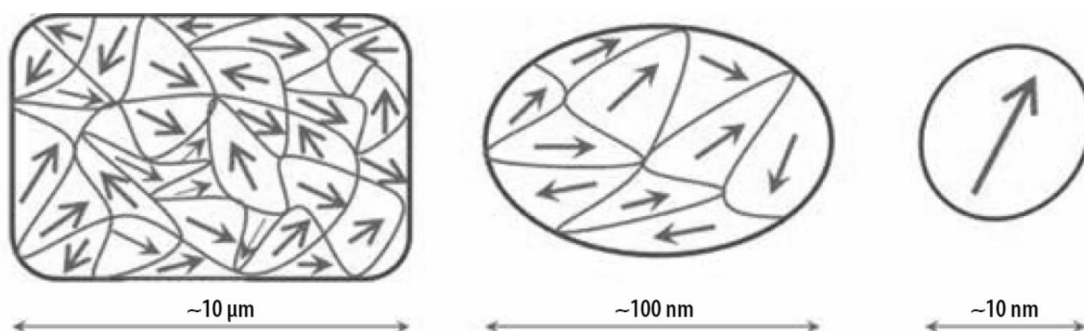
Figura 4 - Esquematização dos múltiplos domínios magnéticos e suas paredes.



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.

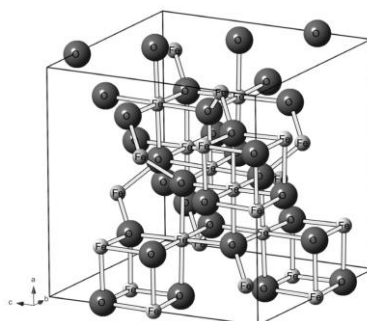


Fonte: Francisquine, E., 2014 ³⁵.

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.



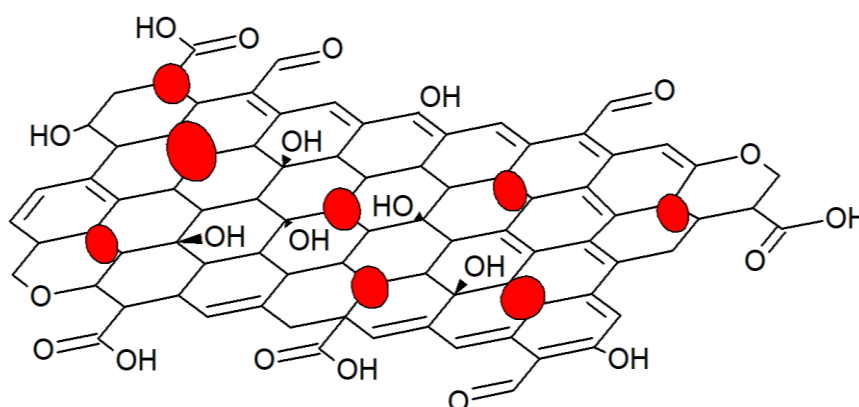
Fonte: Oliveira. L.C.A, *et al* (2013) ⁴⁰.

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.

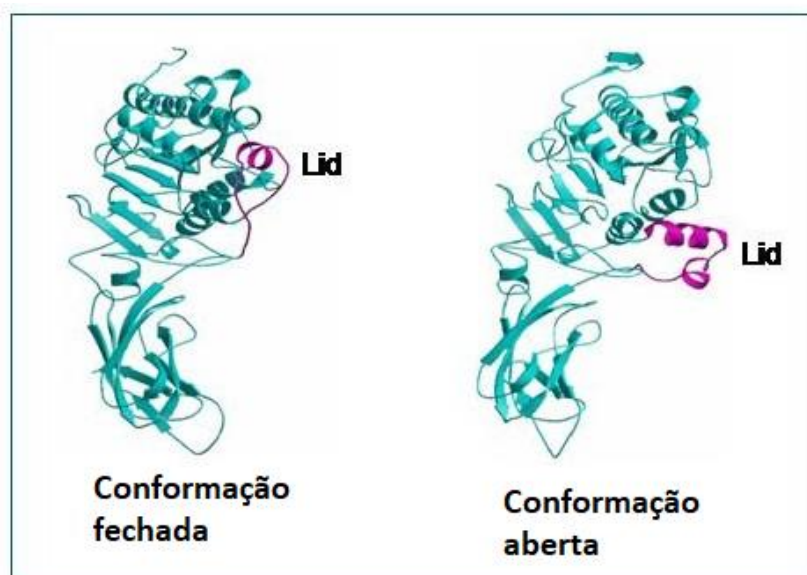
1.4 Lipases

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 lipases 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.

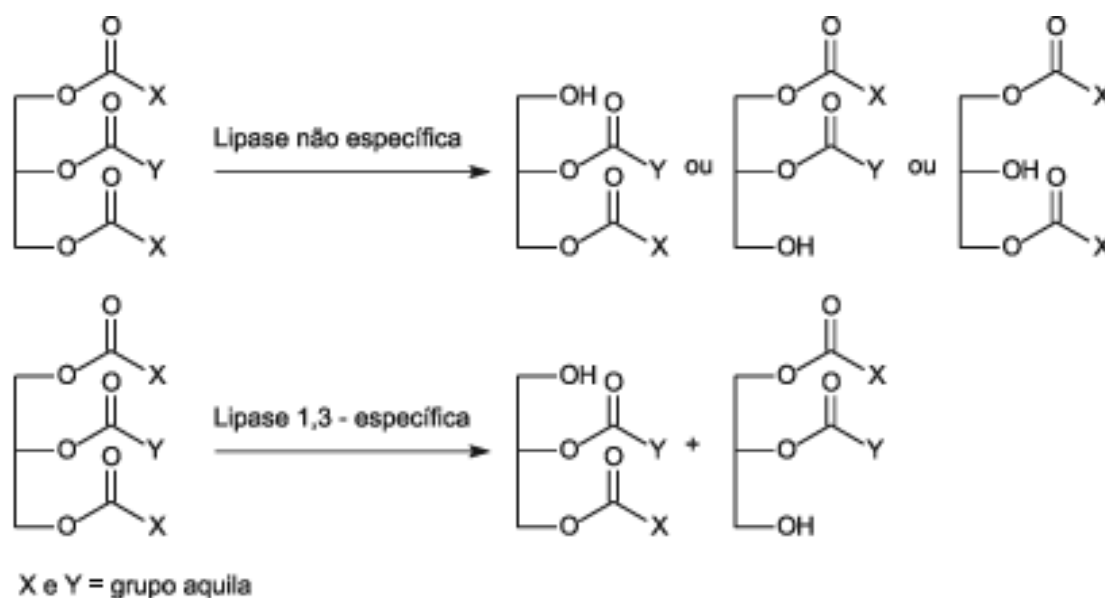


Fonte: Palomo J.M., et al, 2003 ⁵³.

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 regiosseletividade, 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.

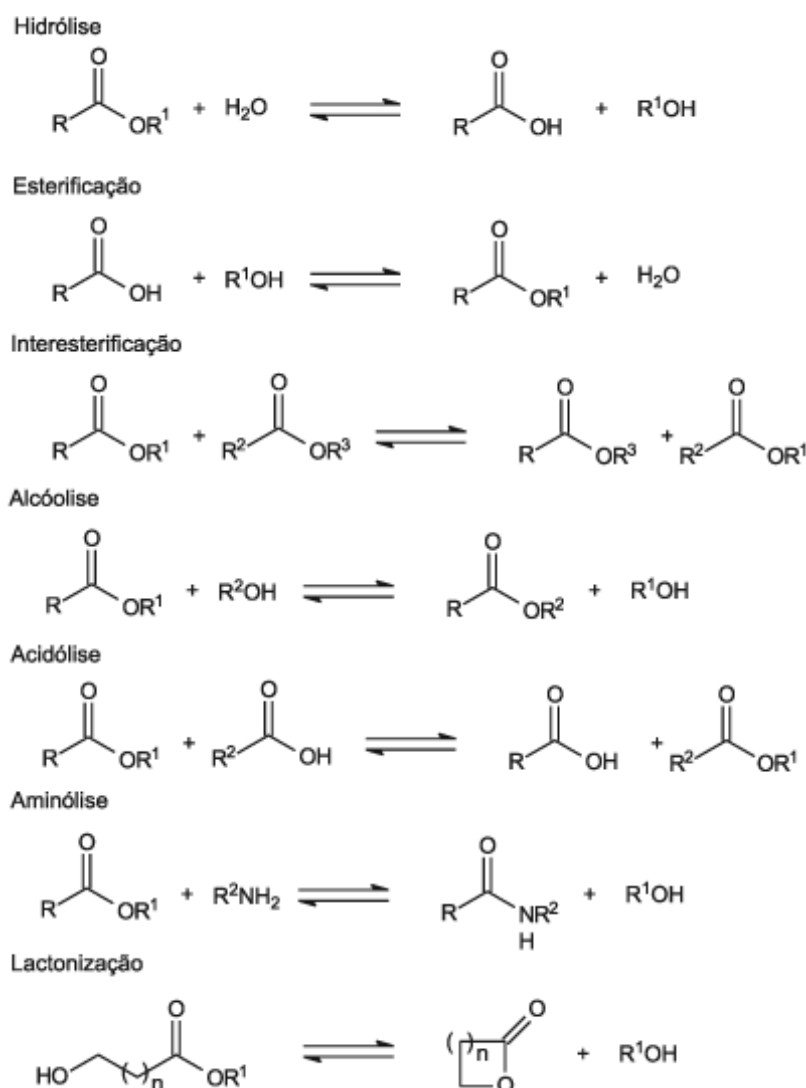
Figura 9 - Reações catalisadas por lipases do tipo não específica e 1,3 específica



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. <i>et al</i> , 2019 ⁶⁰ .
Interesterificação	Modificação de gorduras	Falção, A. O. 2015 ⁶¹ .
Alcóólise	Produção de ésteres específicos	Reinehr, C. O., <i>et al</i> , 2014 ⁶² .
Acidólise	Produção de lipídios estruturados	Sarmah, Nipon, <i>et al</i> , 2018 ⁶³ .
Aminólise	Produção de amidas específicas	Zeng, S. <i>et al</i> , 2018 ⁶⁴ .
Lactonização	Esterificação intramolecular	Messias, <i>et al</i> , 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}.

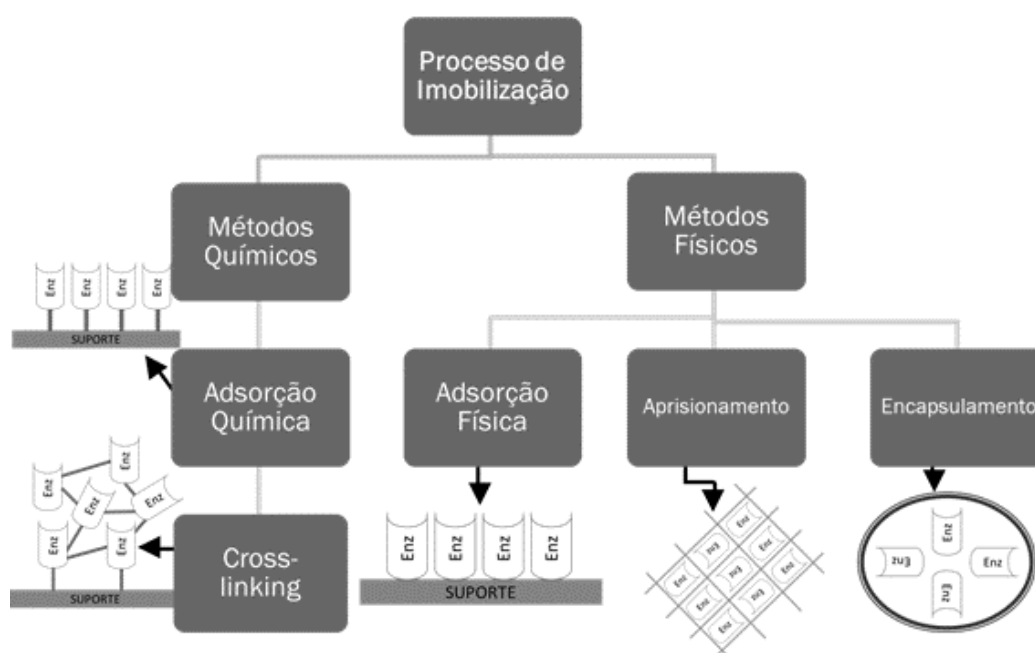
A adsorção física é o método mais comum encontrado para imobilização enzimática, nesse processo as enzimas são adsorvidas na superfície do suporte sem nenhum tratamento adicional. Este procedimento ocorre através de interações eletrostáticas entre o suporte e a enzima, e geralmente possibilita uma alta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

2. OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo geral sintetizar óxido de grafeno magnético visando à aplicação como suporte na imobilização de lipases.

2.1 Objetivos específicos

- Sintetizar o óxido de grafeno a partir do grafite pelo processo de Hummers modificado;
- Adicionar nanopartículas de óxido de ferro magnético em sua superfície pelo método de coprecipitação;
- Imobilizar as enzimas Lipases (*Suína*, *Candida rugosa* e *Aspergillus niger*) na superfície do óxido de grafeno magnético;
- Analisar o efeito da temperatura e do pH na atividade hidrolítica das enzimas e comparar com os valores das mesmas livres;
- Comparar o comportamento enzimático das diferentes lipases imobilizadas;
- Avaliar a estabilidade operacional dos derivados imobilizados.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes utilizados

Azeite comercial San Frediano, extra virgem, grafite (Sigma, +100 mesh), permanganato de potássio (Sigma), ácido sulfúrico (98%, Sigma), cloreto de ferro II e III (Sigma, 99%), (3-aminopropil) trietoxissilano (APTES) (97%, Sigma), hidróxido de amônio (37%), peróxido de hidrogênio 30%, goma arábica, álcool, cetona, tampão fosfato, hidróxido de sódio, hidróxido de potássio (Sigma, 85%), glutaraldeído (25%, Sigma), lipase pancreática suína (LPP), Lipase *Candida rugosa* (LCR), Lipase *Aspergillus niger* (LAN). Para as sínteses que necessitaram de uma atmosfera livre de oxigênio e inerte foi utilizado gás argônio (Ar) comercial.

3.2 Métodos

3.2.1 Síntese de óxido de grafeno

Em um balão de vidro de 3 bocas (250 mL) foi adicionado 1 g de grafite em lascas e 23 mL de ácido sulfúrico, em agitação por 24 horas para facilitar o processo de oxidação. Após esse período o sistema foi colocado em banho de gelo e foram adicionados lentamente 3g de permanganato de potássio. Em seguida a mistura de reação foi agitada por 8 horas e aquecida a 40 °C por 30 minutos. Decorrido esse tempo uma alíquota de 50,0 mL de H₂O destilada foi adicionada e a temperatura elevada a 75°C por 1 hora sob agitação constante. Por fim, ao atingir temperatura ambiente, 150 mL H₂O destilada e 5,0 mL de H₂O₂ 30 % (v/v) foram adicionados.

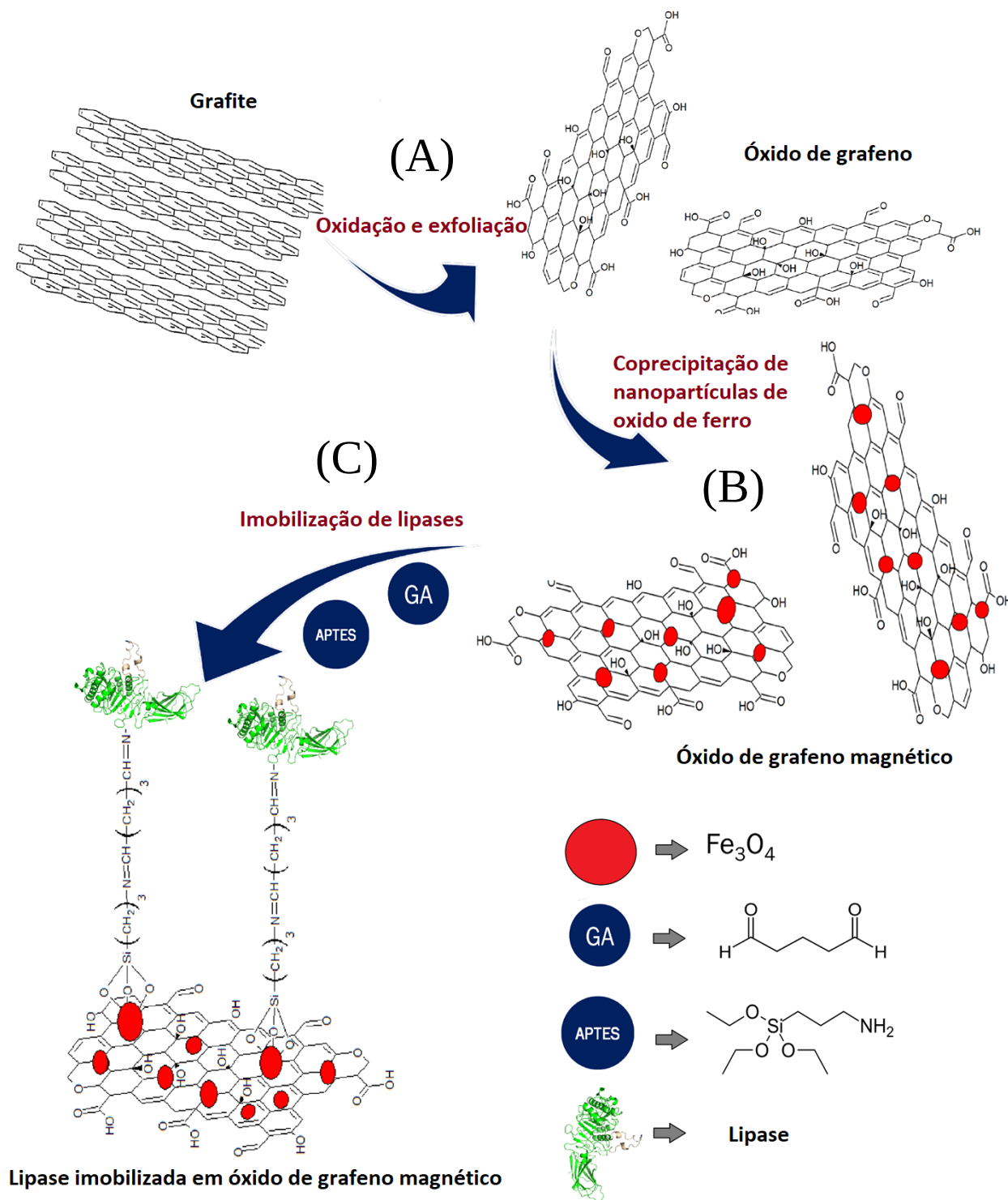
3.2.2 Síntese de óxido de grafeno magnético

Em um béquer, foram adicionados 30 mg de OG e 9,0 mL de NH₄OH 0,01 mol L⁻¹. Uma solução aquosa de ferro foi preparada com a mistura de dois sais com concentração 0,1 mol L⁻¹ de ferro (1:2 de FeCl₂/FeCl₃). O OG em meio básico foi gotejado lentamente sobre a solução de ferro formando as nanopartículas de óxido de ferro na superfície do OG. Em seguida foi adicionado 1 mL de APTES com objetivo de funcionalizar a superfície do óxido de grafeno magnético (OGM) com grupo amino. Para remover os sais não reagidos e os alcóxissilanos policondensados, o OGM precipitado magneticamente foi lavado três vezes com água destilada ⁴⁷.

3.2.3 Imobilização de lipase no suporte magnético

Uma alíquota de 5 mL de OGM funcionalizado com APTS foi retirada e adicionado 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. Em cada imobilização foram utilizadas 50 mg de lipase (LPP, LCR ou LAN) e 50 µl de polietilenoglicol. Ambos foram adicionados na solução e então houve a agitação no vórtex por 5 minutos. A solução permaneceu em repouso por 16 horas em ambiente refrigerado. Utilizando um ímã para a separação da amostra do meio aquoso, a solução foi lavada 5 vezes com tampão fosfato (pH 7,4) para a retirada de lipases livres. Toda a metodologia apresentada para síntese do suporte magnético e imobilização enzimática estão representadas de forma resumida na Figura 12.

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.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 Caracterizações

3.3.1 Análise térmica por TG/DTA

O estudo do comportamento térmico das amostras de grafite e de OG foi realizado por análise de TG/DTA no equipamento METTLER TOLEDO SCSTARe System, com uma taxa de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25 a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ e atmosfera de ar sintético.

3.3.2 Espectroscopia na região do infravermelho

O Espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier - VERTEX 70 da BRUKER com módulo ATR (Espectroscopia de absorção na região do infravermelho médio por meio de reflexão total atenuada (cristal de diamante)) foi utilizado para obter informações sobre a composição das amostras em cada etapa de síntese do suporte. Na coleta dos espectros foram realizadas 64 varreduras e uma resolução de 4 cm^{-1} no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} .

3.3.3 Difração de raios X

Para identificar fases cristalinas, presentes tanto no grafeno, quanto na nanopartícula de óxido de ferro foi utilizado o difratômetro de raios X marca SIEMENS modelo D5005, Radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\alpha = 1,5418\text{ \AA}$). As medidas foram feitas em um intervalo de varredura de 5 a 80° (2θ), com velocidade de varredura $0,01^{\circ}$ por segundo. Utilizando a equação de Bragg, equação 6, foi determinado a distância interplanar das amostras.

$$2d \sin\theta = \lambda \quad \text{Equação 6.}$$

Onde, d refere-se à distância interplanar no cristal, θ o ângulo entre o vetor de onda incidente e os planos cristalinos da amostra e λ o comprimento de onda da radiação incidente.

3.3.4 Espectroscopia Raman

A fim de estabelecer informações sobre as características estruturais, moleculares e eletrônicas dos materiais carbônicos foi utilizado o equipamento LabRAM RH (Horiba), que possui um laser de Ar arrefecido com He-Ne no comprimento de onda

de 632,81 nm e de potência de excitação de 0,17 mW. Os espectros foram obtidos de 500-2500 cm^{-1} , tendo como tempo de integração 60 segundos.

3.3.5 Microscopia eletrônica de varredura

As amostras de óxido de grafeno e óxido de grafeno magnético foram dispersas e diluídas em álcool utilizando ultrassom de ponteira, seguido do gotejamento de 5,0 μL da amostra sobre o substrato de óxido de silício (SiO_2/Si). As medidas foram realizadas em microscópio eletrônico de varredura, JEOL JSM 7500F, com tensão de aceleração de 2,0 kV. Essa técnica foi utilizada para analisar as características morfológicas do suporte.

3.3.6 Atividade hidrolítica de lipase imobilizada e livre

Foram misturados 2,5 mL de azeite de oliva e água (1:1) e 2 mL de tampão 0,1 mol L^{-1} , que variaram de pH 3 ao 10. A faixa de 30 a 70 $^{\circ}\text{C}$ foi utilizada para determinar a temperatura ideal. O sistema reacional foi mantido sob agitação em banho termostatzado. Em seguida foram adicionados 2 mL do derivado imobilizado, mantendo o sistema sob agitação, a 37 $^{\circ}\text{C}$, 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^{-1}). O excesso de KOH foi titulado com HCl padronizado (0,05 mol L^{-1}). Para calcular a atividade enzimática relativa foi utilizada a equação 7:

$$A = \frac{(V_b - V_a) \times M \times 10^6}{t \times m} \quad \text{Equação 7}^{81}.$$

Onde, 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^{-1}), t= Tempo de incubação (minutos) e m= massa do biocatalisador adicionado (g).

Sendo determinado então o ponto de maior atividade enzimática das enzimas analisadas, esses valores foram considerados como 100% e os demais valores foram normalizados por essas atividades máximas a fim de obter um gráfico de atividade relativa.

3.3.7 Estabilidade operacional

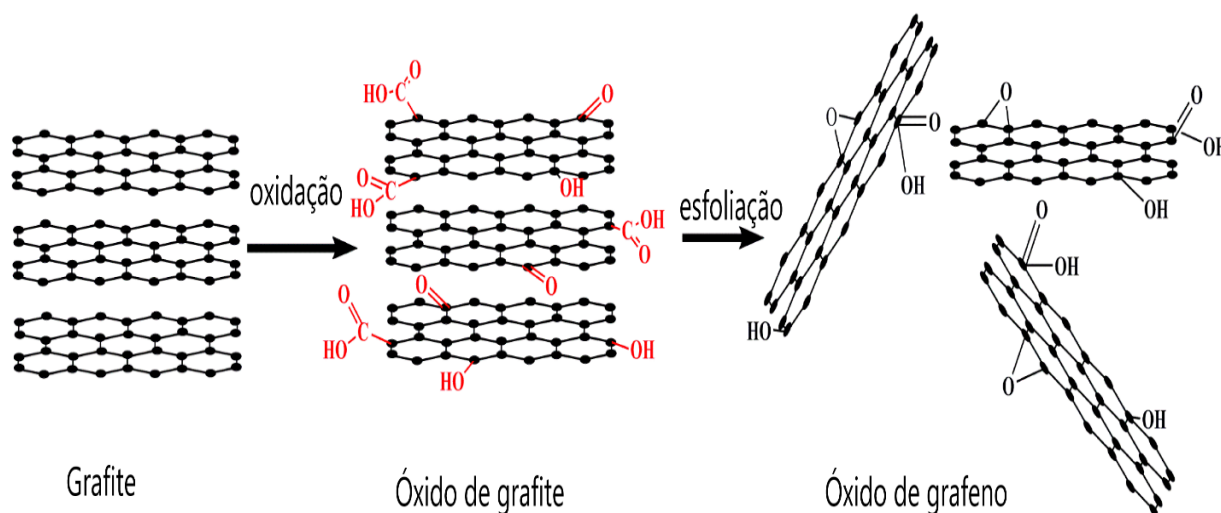
Utilizando as condições ótimas de pH e temperatura, assim como as quantidades mínimas de lipase necessárias para uma separação magnética efetiva, a estabilidade operacional foi avaliada em reusos consecutivos. A lipase imobilizada foi separada da emulsão usando um campo magnético externo. As amostras foram lavadas duas vezes com solução tampão de fosfato e usadas novamente em uma nova mistura de reação para estudar a reutilização em múltiplos ciclos (máximo de 6 ciclos).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Síntese de óxido de grafeno

Na Figura 13 tem-se o esquema de como ocorreu o processo de obtenção do óxido de grafeno, consistindo na oxidação do grafite e utilização de ultrassom para efetuar a esfoliação das folhas interlamelares

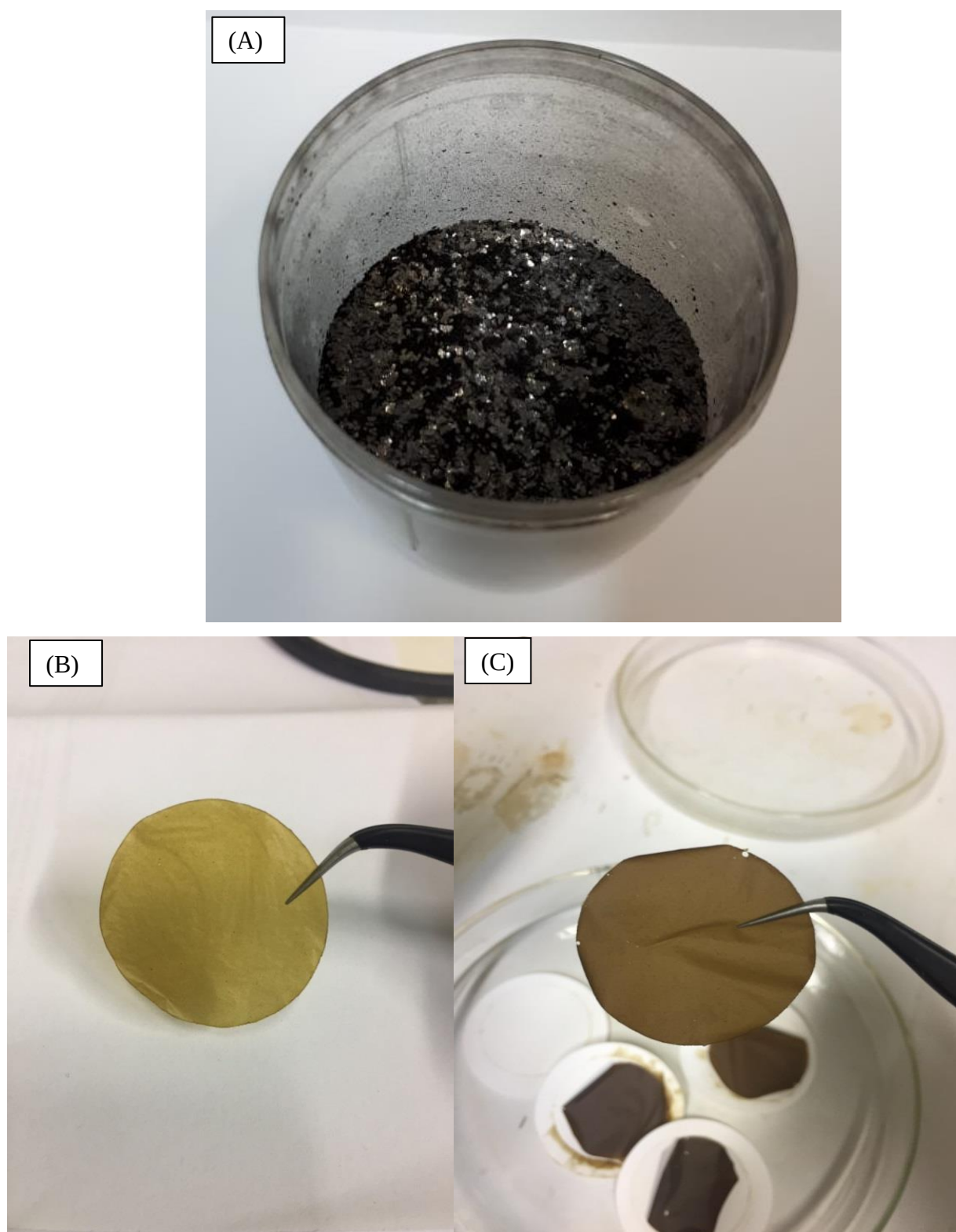
Figura 13 - Esquema de obtenção de óxido de grafeno.



Fonte: Adaptado de Li, Z.J, *et al*, 2014 ⁸².

A oxidação do grafeno pode ser evidenciada comparando a cor do precursor grafite (cinza/ou grafítica) (Figura 14A) com a cor marrom do óxido de grafite (OGT) (Figura 14B) e do óxido de grafeno (Figura 14C). Com a adição de grupos funcionais oxigenados sobre as lamelas de grafeno há a quebra das ligações entre os planos, rompendo as ligações π e modificando assim a hibridização sp^2 para sp^3 . Essa mudança de coloração está relacionada com o método de oxidação química escolhida ⁸³. A redução das folhas de óxido de grafeno, através de processos químicos ou térmicos, pode acontecer, fazendo com que a coloração inicial (cinza/grafítica) retorne ⁸⁴. A diferença de tonalidade das amostras de óxido de grafite e óxido de grafeno (Figuras 14B e 14C) é resultado da concentração de material, sendo a amostra de óxido de grafite menos concentrada.

Figura 14 - (A) Amostra de grafite. (B) Amostra de óxido de grafite. (C) Amostra de óxido de grafeno.

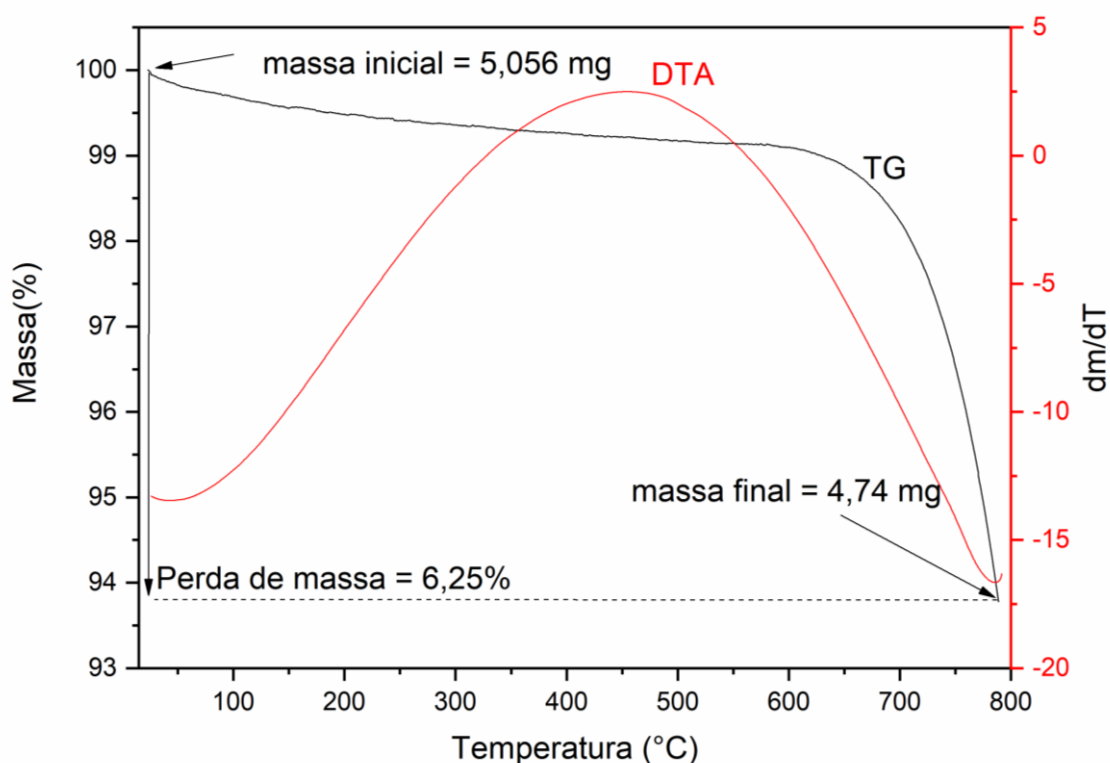


Fonte: Autor.

4.1.1 Análise térmica por TG/DTA

Através das análises termogravimétricas (Figuras 15 e 16) é possível comparar os diferentes comportamentos térmicos entre a amostra de grafite com a amostra de óxido de grafeno. Na figura 15 observa-se que o grafite se manteve estável até próximo a 600°C e tendo então o início da decomposição do esqueleto de carbono, perdendo cerca de 6,25% de sua massa inicial, relacionada com a liberação de CO e CO₂⁸⁵. A técnica termogravimétrica foi realizada até 800°C, temperatura onde é iniciada a decomposição total da estrutura grafítica, que vai até próximo de 900°C⁸⁶. A DTA confirma então a degradação da estrutura carbônica através de um evento térmico de oxidação seguida por sua decomposição.

Figura 15 - Curva termogravimétrica da amostra de grafite.



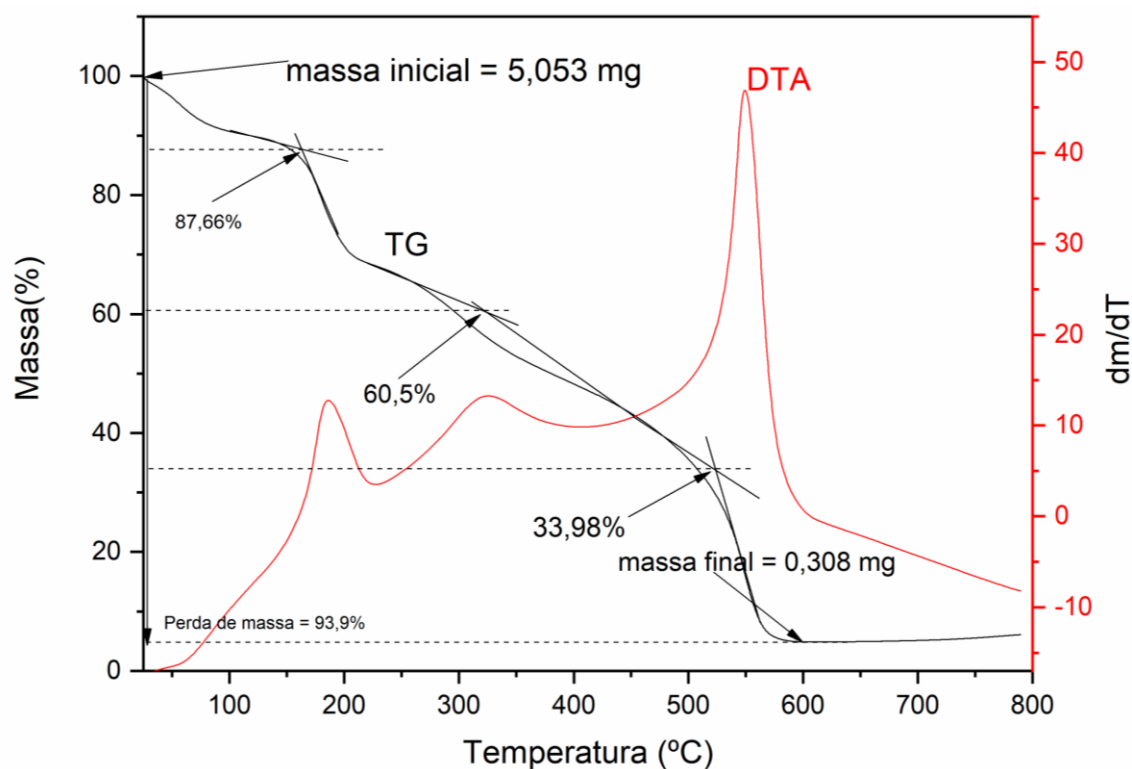
Fonte: Autor.

É apresentado na Figura 16 a curva termogravimétrica da amostra de grafeno, onde é observado a presença de três eventos térmicos, o primeiro entre 100 a 200°C, atribuído à perda de água livre presente na amostra⁸⁵, correspondente a 13,3% da massa inicial. O segundo evento na faixa de 250 a 450 °C corresponde a degradação, através do processo de descarboxilação, dos grupos oxigenados fracamente ligados às

folhas de óxido de grafeno, na forma de CO e CO₂, representando cerca de 29,5% da massa inicial ⁸⁷.

O último evento na faixa de 450 a 600°C, com um intenso pico na curva DTA, é resultado da decomposição tanto de grupos funcionais mais estáveis presentes, tais como epóxi, como também da própria estrutura carbônica, resultando em uma perda de 93,9% de massa inicial.

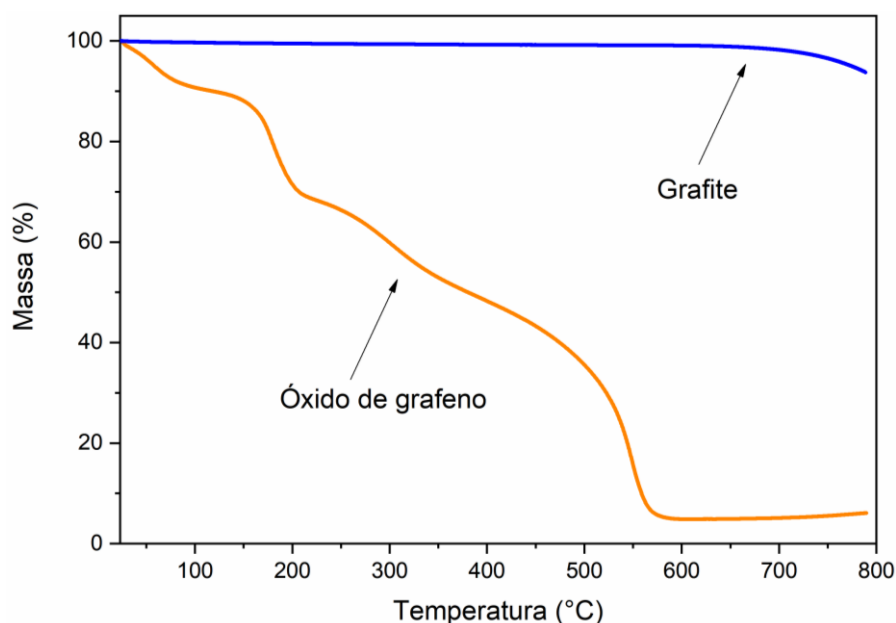
Figura 16 - Curvas termogravimétricas da amostra de óxido de grafeno.



Fonte: Autor

Afim de comprovar a diferença de estabilidade térmica das amostras de grafite e óxido de grafeno, é apresentado na Figura 17 de forma comparativa seus respectivos termogramas. O grafite é a forma mais estável dos alótropos do carbono, possuindo redes infinitas de folhas de grafeno com pouquíssimas falhas na estrutura cristalina, sendo necessário assim muita energia para sua decomposição ⁸⁸. Para que ocorra então a degradação completa do grafite altas temperaturas são requeridas. Já com a presença de inúmeros grupos oxigenados no óxido de grafeno e com o rompimento das ligações de van der Waals entre os planos, haverá a presença de falhas nas redes de grafeno, tornando seu comportamento térmico distinto do grafite e tendo sua estabilidade térmica reduzida.

Figura 17 - Curvas termogravimétricas das amostras de grafite e óxido de grafeno.



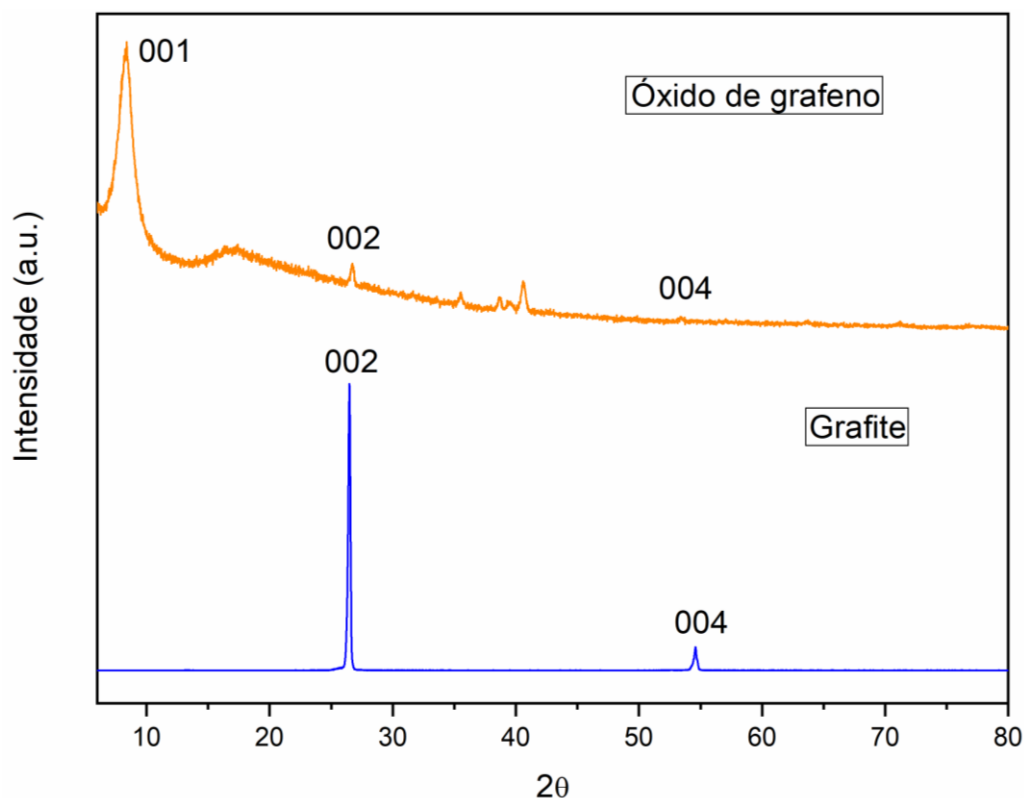
Fonte: Autor

4.1.2 Difração de raios X

A Figura 18 mostra o difratograma de raios - X das amostras de grafite comercial e de OG sintetizado. Usando a equação de Bragg, foi calculada a distância interlamelar das estruturas carbônicas de cada composto. Por se tratar de um material com estrutura cristalina uniforme e altamente organizado, o difratograma de raios X do grafite apresentou picos de difração com pouco ruído e bem definido. Os dois picos indexados característicos do grafite podem ser observados, sendo eles (002) em $26,4^\circ$ e (004) em $54,8^\circ$ ⁸⁹. O pico de difração mais intenso em $26,4^\circ$ representa a distância entre camadas 2D de grafeno, sendo igual a 0,336 nm.

Embora ainda apresente picos indexados nas mesmas regiões que o grafite, causado pela presença de material não oxidado, o óxido de grafeno produzido através do método de Hummers modificado possui um intenso pico indexado não mais na mesma posição que seu precursor, mas sim em $8,31^\circ$ (001), apresentando então uma distância interlamelar de 1,06 nm. Devido à adição de grupos funcionais oxigenados (como ligações de carboxilas, epóxidos, hidroxilas), assim como a reação envolvendo permanganato de potássio (responsável pela quebra dos planos basais do grafite), as camadas de grafeno tiveram seu espaçamento entre os planos aumentado⁸³. A diferença dessas posições de picos indica uma alta oxidação da amostra gráfitica confirmando a síntese do óxido de grafeno⁹⁰.

Figura 18 - Difrátogramas de raios x das amostras de grafite e óxido de grafeno.



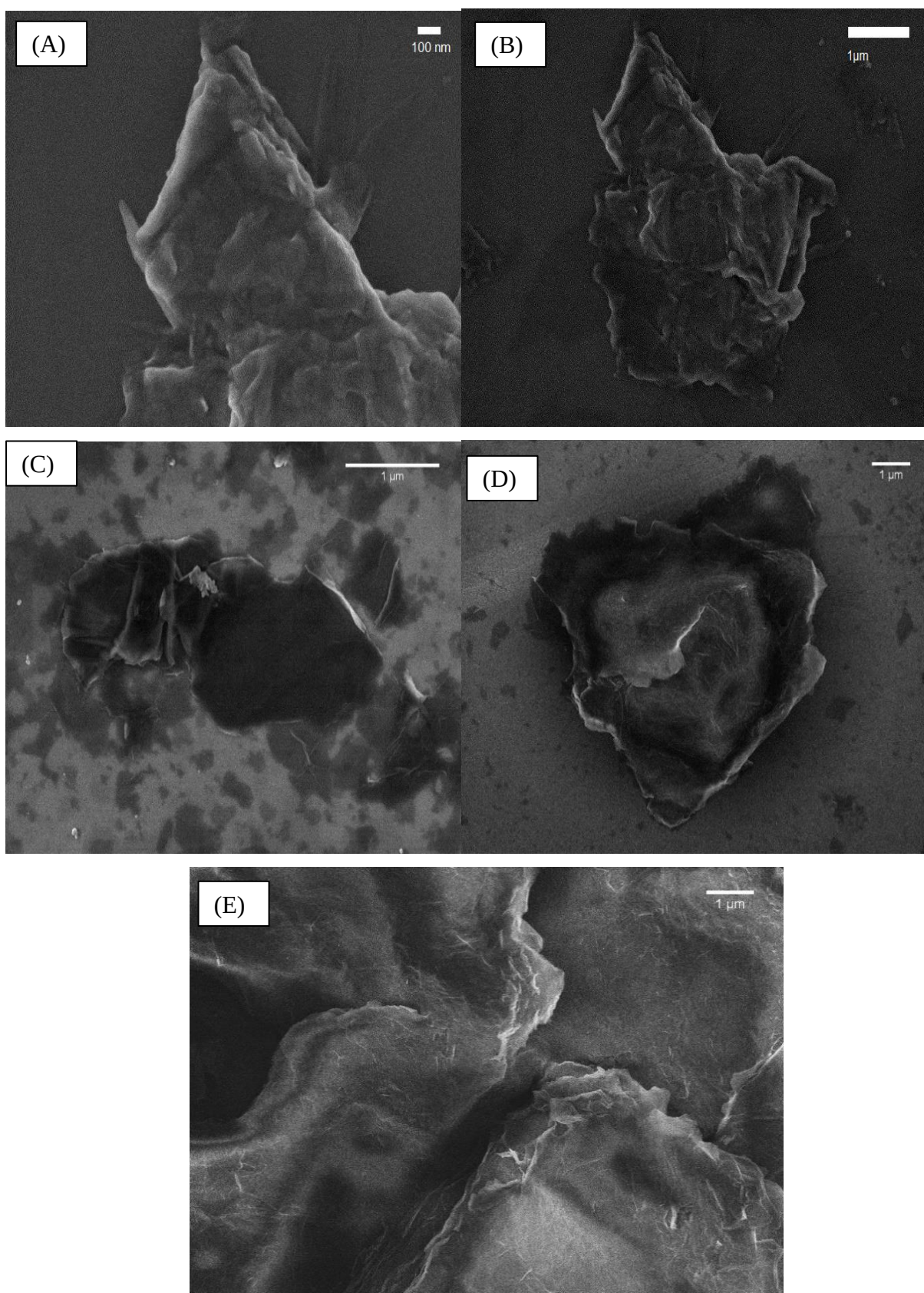
Fonte: Autor.

4.1.3 Microscopia eletrônica de varredura

A técnica de microscopia eletrônica de varredura possibilitou analisar as características morfológicas das amostras de óxido de grafeno. As micrografias na Figura 19 são de duas sínteses, a primeira síntese (micrografias A e B) as lamelas de grafeno encontram-se muito próximas umas das outras, ocasionado pelo baixo índice de oxidação dessa amostra.

Já para a segunda síntese (micrografias C, D e E) são observadas morfologia de folhas que o composto carbônico adquiriu. Esses efeitos ocorrem devido aos defeitos na estrutura e estão diretamente relacionados ao grau de oxidação ⁹¹. Com a presença dos grupos funcionais oxigenados há o aumento do espaçamento interplanar, tornando mais distinta as camadas 2D.

Figura 19 – Micrografias eletrônicas de varredura das folhas de óxido de grafeno A e B (primeira síntese), C, D e E (segunda síntese).



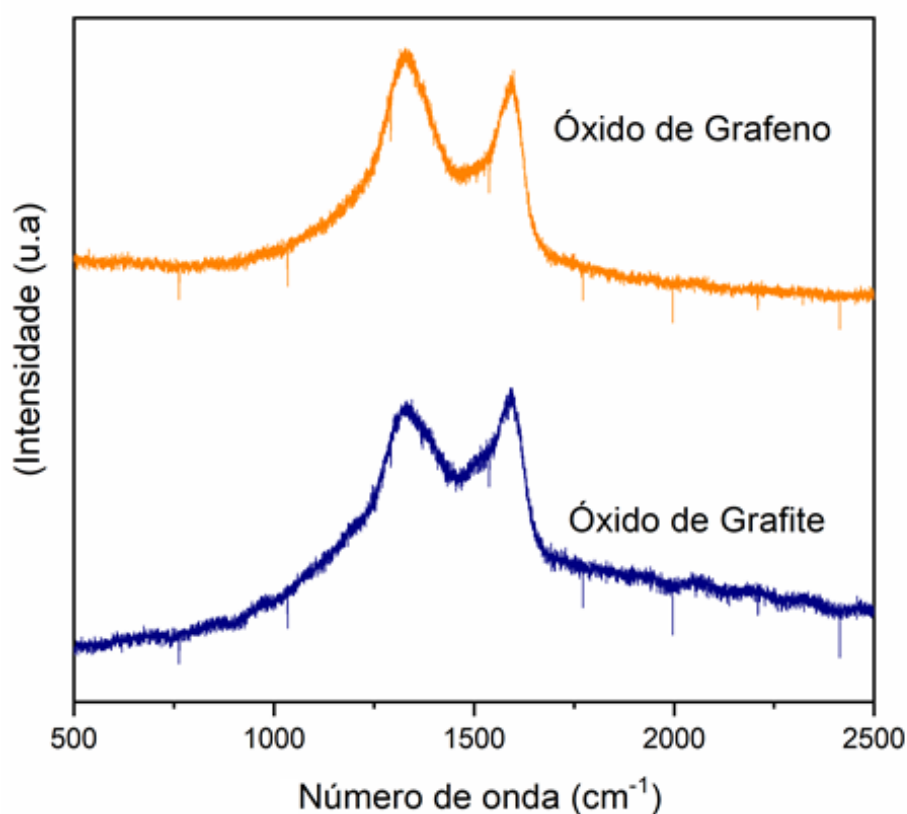
Fonte: Autor.

4.1.4 Espectroscopia Raman

Em cada etapa de modificação do precursor grafite foram feitas caracterizações afins de confirmar a existência da estrutura carbonácea do óxido de grafeno. A espectroscopia Raman é amplamente utilizada como ferramenta para caracterizar compostos carbônicos, sendo de fácil caracterização materiais com ligações de carbonos conjugados e duplas ligações carbono-carbono.

Nos espectros da Figura 20, é possível observar duas bandas, D (1200 a 1400 cm^{-1}), que está relacionada a vibrações carbono-carbono que possuem hibridização sp^3 e G (1500 a 1600 cm^{-1}) referentes a vibrações carbono-carbono com hibridização sp^2 ⁹².

Figura 20 - Espectro Raman das amostras de OGT e OG.



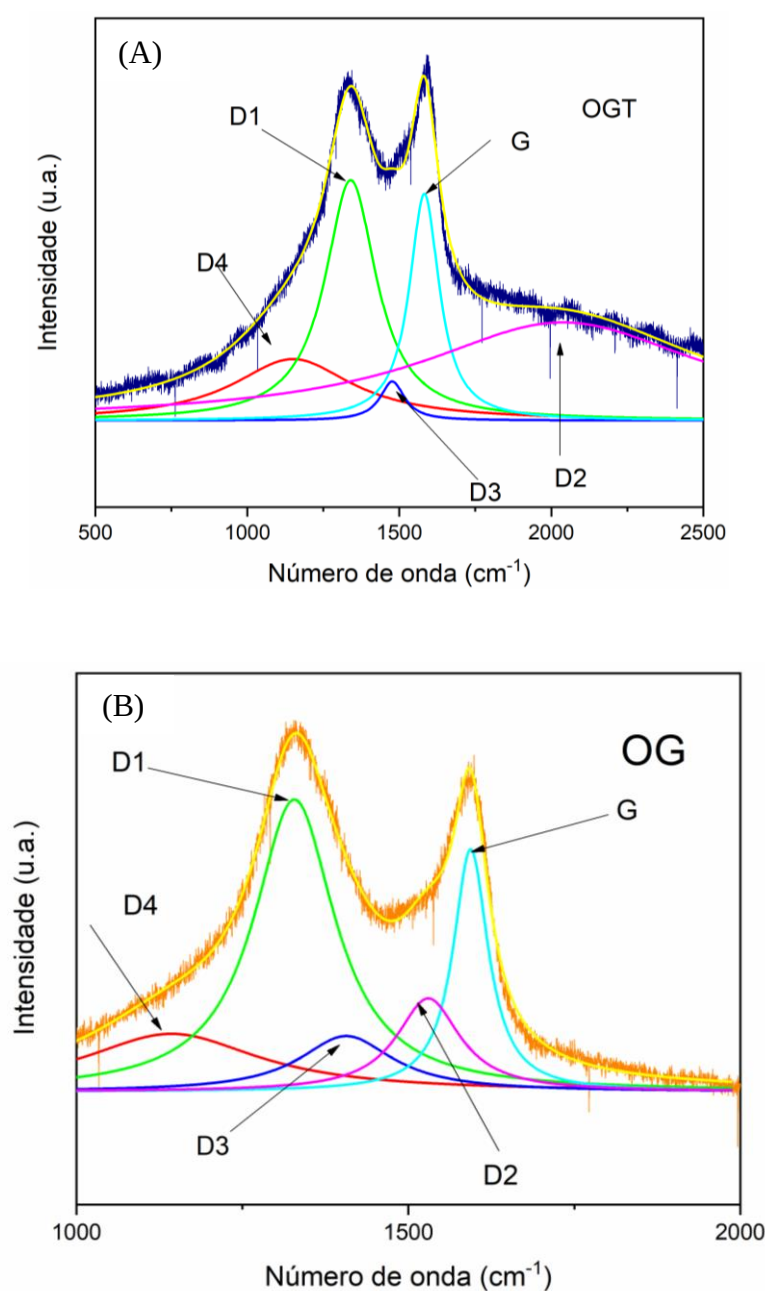
Fonte: Autor

Embora as duas amostras possuam as características de estruturas gráficas, confirmados pelas bandas D e G, elas se diferem quanto a intensidade da banda D. Essa variação ocorre pelo surgimento de defeitos ao longo das modificações feitas nas folhas de grafeno. Com a oxidação das folhas, há o aumento de falhas, ou desordem,

nas redes hexagonais, causadas pela alteração das ligações C-C com hibridização sp^2 , para ligações C-C com hibridização sp^3 , aumentando a intensidade da banda D.

O óxido de grafite foi o material analisado com menor grau de desordem na estrutura, sua banda D é menos intensa que a banda G. O grau de desordem na estrutura gráfica foi calculado pela razão da intensidade das bandas (I_D/I_G), utilizando a intensidade relativa da deconvolução dos espectros pela função lorentziana, como ilustrado na Figura 21.

Figura 21 - Deconvoluções dos espectros de Raman de (A) OGT e (B) OG.



Fonte: Autor.

Com a deconvolução das bandas D e G, há o surgimento das bandas D1, D2, D3, D4 e G, como mostrado na Figura 21. Para determinar os parâmetros I_D/I_G , foram utilizados os valores de intensidade de D1 e G das amostras de OGT e OG, apresentados na Tabela 1. O parâmetro I_D/I_G próximo a zero representa uma estrutura carbonácea com poucos defeitos e, quanto maior esse valor for mais desordenada essa estrutura pode ser considerada. Ambas amostras apresentam valores maiores que zero, devido aos procedimentos de oxidação sofridos pelo método de Hummers modificado, resultando assim em um maior grau de desordem estrutural. O OGT possui menor quantidade de defeitos, se comparado com a amostra OG, pois ainda não foi submetido a etapa de esfoliação mecânica.

Tabela 3 – Valores de I_D/I_G das amostras OGT e OG.

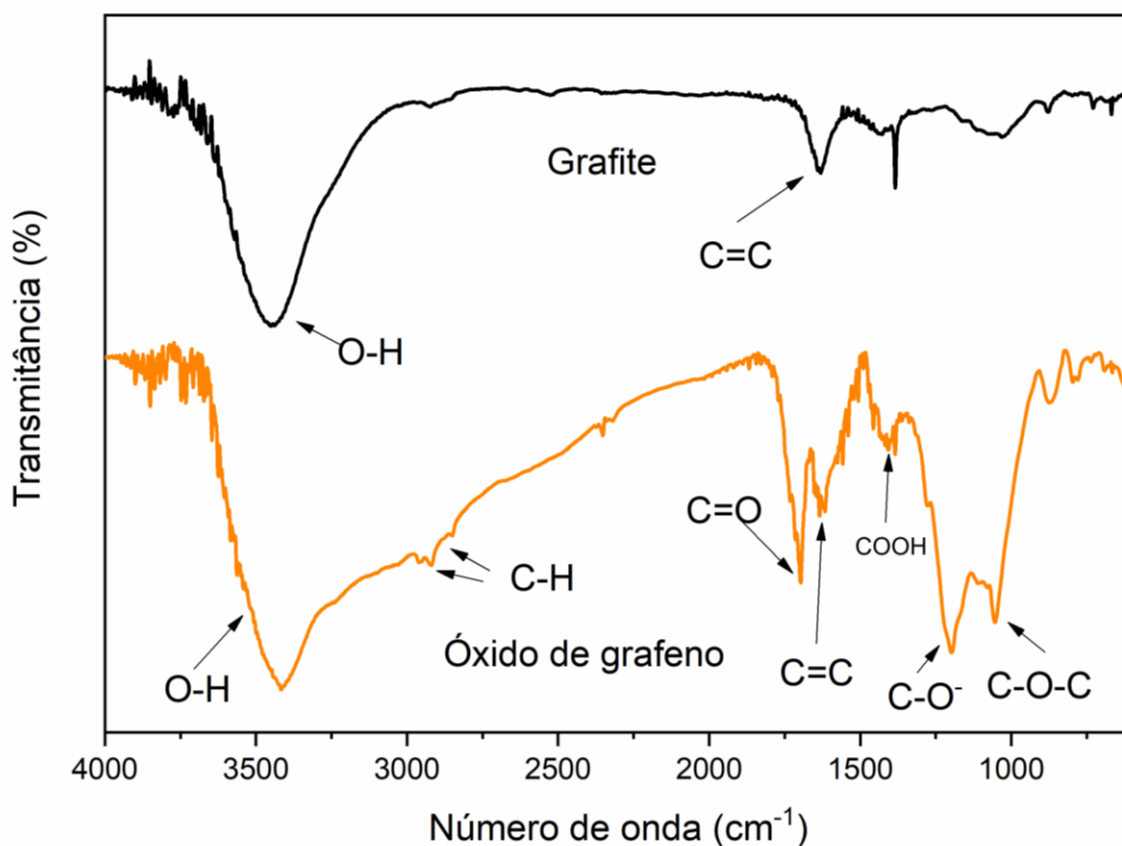
Amostra	I_D/I_G
OGT	1,02
OG	1,06

Fonte: Autor.

4.1.5 Espectroscopia na região do infravermelho

Para detecção de grupos funcionais presentes na estrutura da amostra OG, foi empregado a técnica de espectroscopia no infravermelho e feita a comparação com a amostra do precursor grafite (Figura 22). Em ambos espectros foram observadas as seguintes bandas: em 3700 a 3000 cm^{-1} (atribuídas tanto a água quanto ligações -C-H de grupos aromáticos), banda em 1620 cm^{-1} (C=C , aromáticos) e uma banda $\sim 1400 \text{ cm}^{-1}$ (atribuídas ao grupo -COOH)⁸⁹. Já na amostra de óxido de grafeno são encontradas ainda 2 bandas em 2922 e 2850 cm^{-1} (ligações -C-H), banda $\sim 1710 \text{ cm}^{-1}$ (ligação C=O , carbonila/carboxila) e bandas em 1204 e 1050 cm^{-1} (grupos C-O^- , alcóxil; C-O-C , epóxil, respectivamente), confirmando a oxidação das folhas de grafeno⁹³.

Figura 22 - Espectros na região do Infravermelho das amostras de grafite e óxido de grafeno.

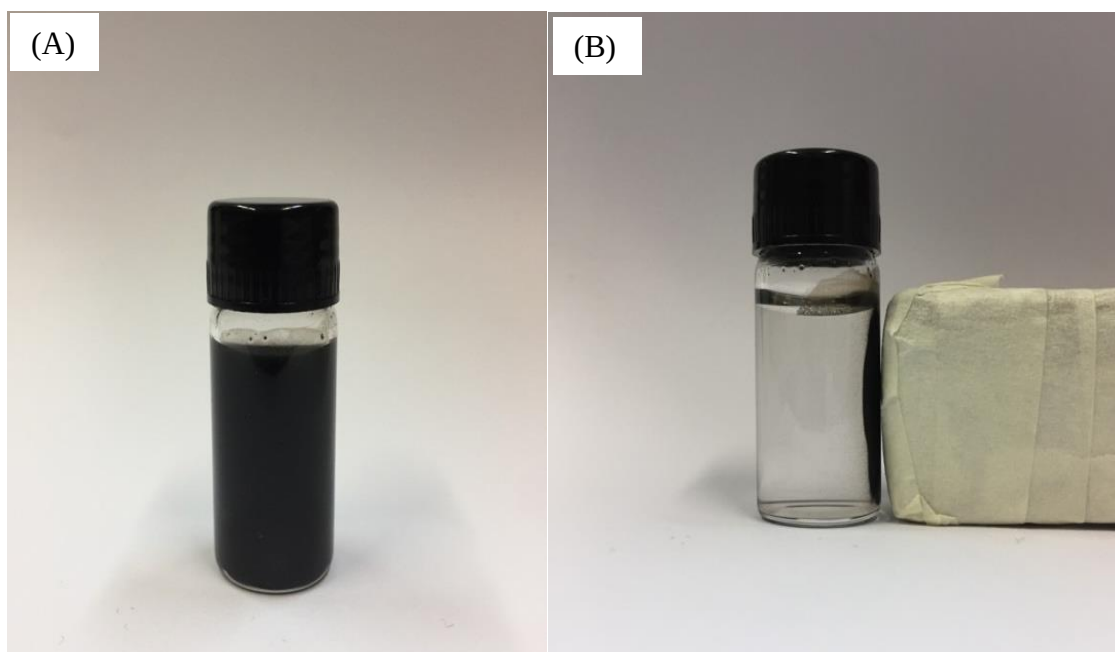


Fonte: Autor

4.2 Síntese do óxido de grafeno magnético

A amostra de óxido de grafeno magnético foi observada qualitativamente, como observada na Figura 23. Com a aplicação de um campo magnético externo (ímã) houve à separação do suporte que se encontrava em meio aquoso confirmando a presença material magnético aderido as folhas óxido de grafeno. Essa característica magnética adquirida é atribuída a modificação da superfície do suporte com a adição, pelo método de coprecipitação, de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro ⁴⁸.

Figura 23 – (A) Amostra antes da aplicação do imã; (B) Amostra após da aplicação do imã.



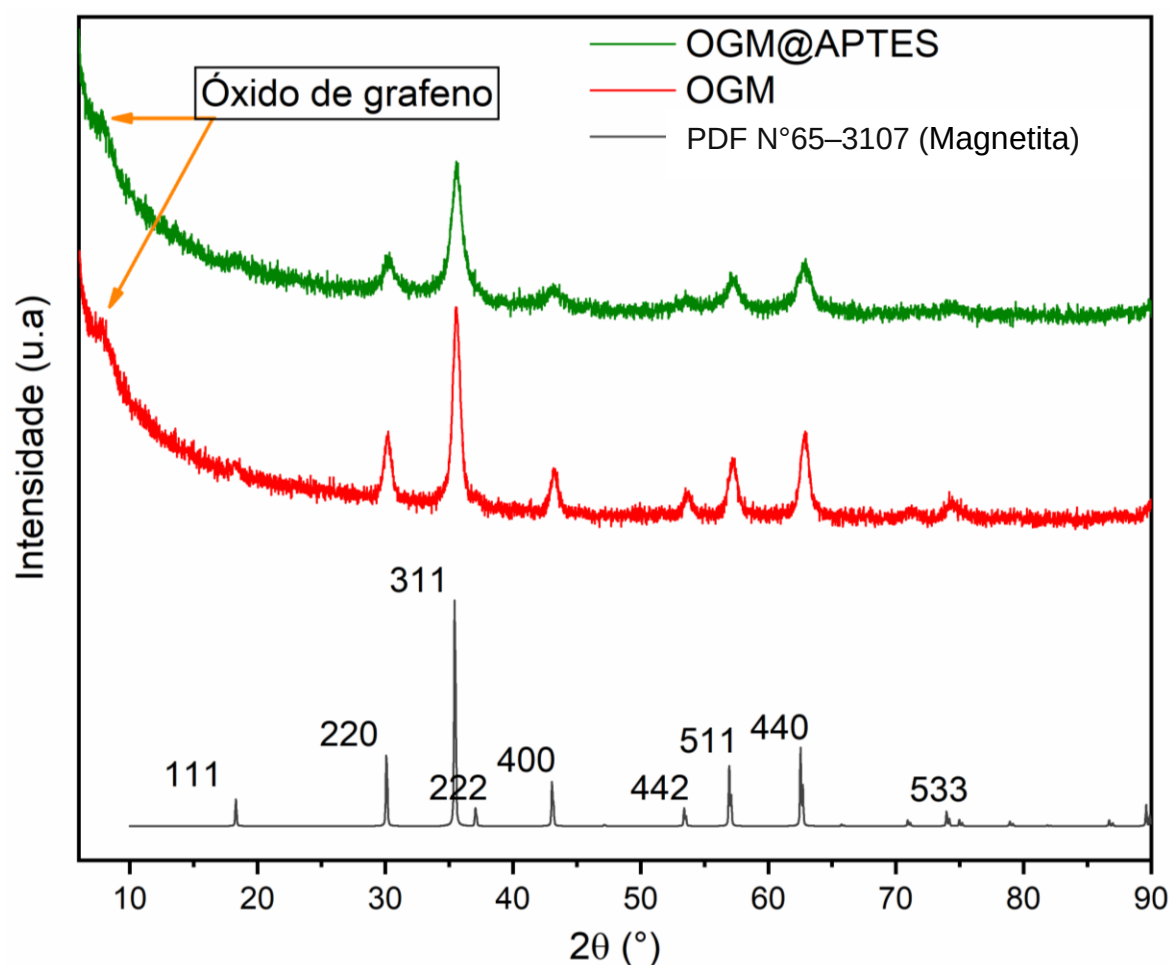
Fonte: Autor.

4.2.1 Difração de raios X

No difratograma de raios X apresentado na Figura 24, tem-se as amostras de óxido de grafeno magnético e óxido de grafeno magnético com APTES, assim como do padrão de difração de raios X da magnetita, PDF N° 65–3107. Os picos de difração das duas amostras, encontrados em 18,24°, 30,14°, 35,42°, 42,99°, 53,50°, 56,93°, 62,44° e 74°, podem ser respectivamente atribuídos aos planos cristalinos de Fe_3O_4 (111), (220), (311), (400), (442), (511), (440), (533), encontrados no padrão de magnetita e confirmando a presença de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro ⁴³.

Em ambas amostras também são encontrados picos de difração próximos a 8°, característicos das folhas de óxido de grafeno e relacionados a estrutura grafítica ainda presente no material. O procedimento de funcionalização com APTES é requerido para as etapas futuras de aplicação do suporte, facilitando sua interação com as lipases de interesse. Contudo, através do difratograma da amostra funcionalizada pode-se confirmar que os agentes aminosilanos adicionados não alteraram a estrutura cristalina de Fe_3O_4 .

Figura 24 - Difratoograma de Raios X comparando o padrão magnetita com as amostras de óxido de grafeno magnético e óxido de grafeno magnético funcionalizado.

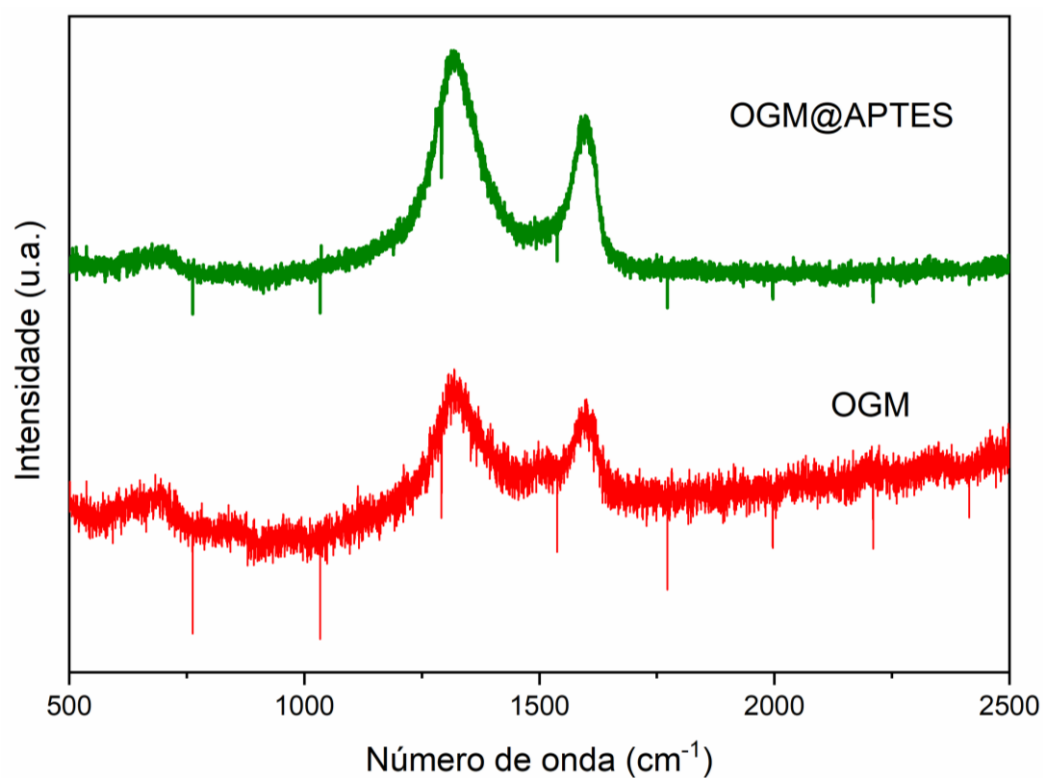


Fonte: Autor.

4.2.2 Espectroscopia Raman

Para determinar existência da estrutura carbonácea de óxido de grafeno, assim como indicar os parâmetros I_D/I_G , as amostras de OGM e OGM@APTES foram submetidas a espectroscopia Raman, apresentada na Figura 25. A presença das bandas D (1200 a 1400 cm^{-1}) e G (1500 a 1600 cm^{-1}), relacionados ao óxido de grafeno, foram identificadas. Dessa forma, mesmo com as características magnéticas referente as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro presentes e a funcionalização do suporte com agentes aminosilanos, o óxido de grafeno modificado manteve sua estrutura.

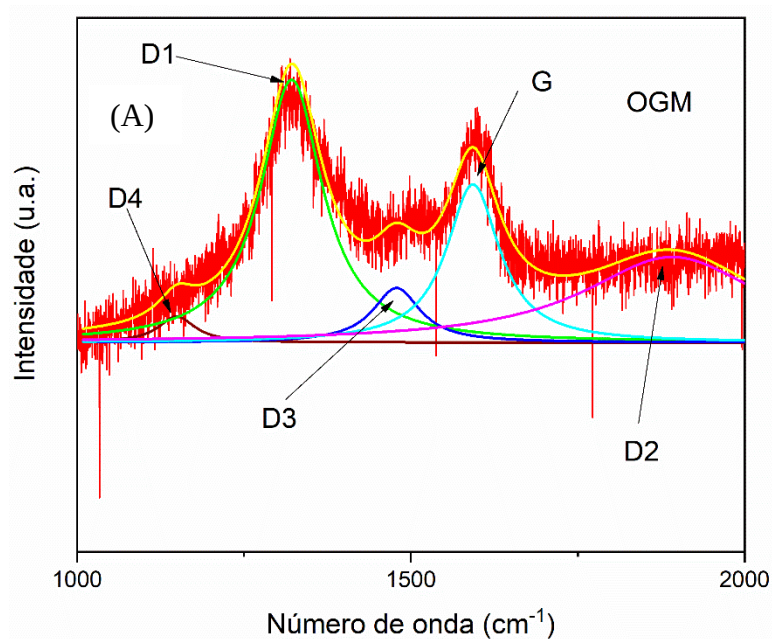
Figura 25 - Espectro Raman das amostras (A) OGM e (B) OGM@APTES.

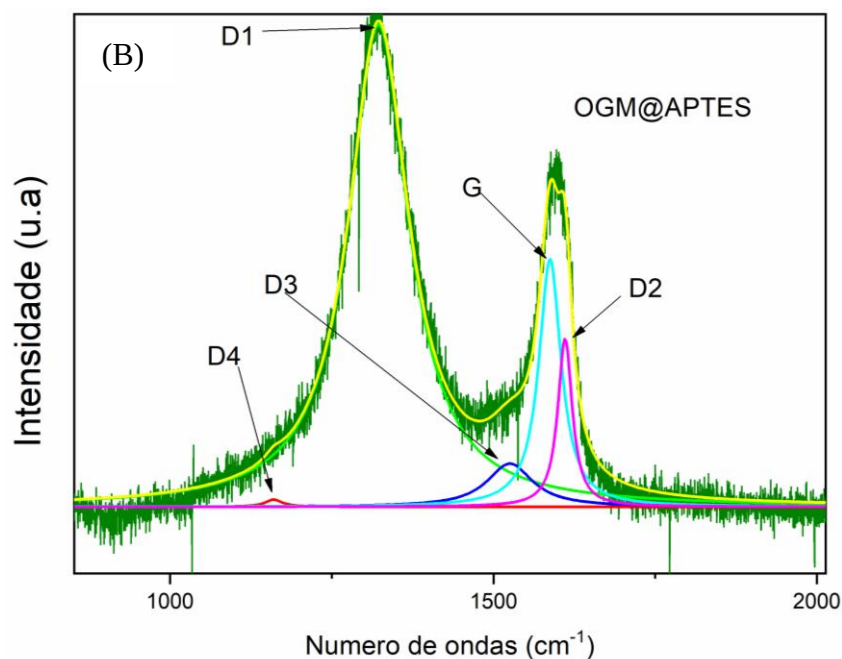


Fonte: Autor.

Afim de calcular os parâmetros I_D/I_G , as bandas D e G das amostras OGM e OGM@APTES foram deconvoluídos, Figura 26.

Figura 26 - Deconvoluções dos espectros de Raman de OGM e OGM@APTES.





Fonte: Autor.

Com a deconvolução dos espectros Raman houve o surgimento das bandas D1 e G, utilizados para calcular os parâmetros I_D/I_G , apresentados na Tabela 2.

Tabela 4 – Valores de I_D/I_G das amostras OGM e OGM@APTES.

Amostra	I_D/I_G
OGM	1,07
OGM@APTES	1,13

Fonte: Autor

Com novas etapas de modificação das folhas de óxido de grafeno, tais como coprecipitação de nanopartículas magnética e funcionalização com agentes aminosilanos há o aumento do grau de desordem da estrutura, confirmados pelos parâmetros I_D/I_G .

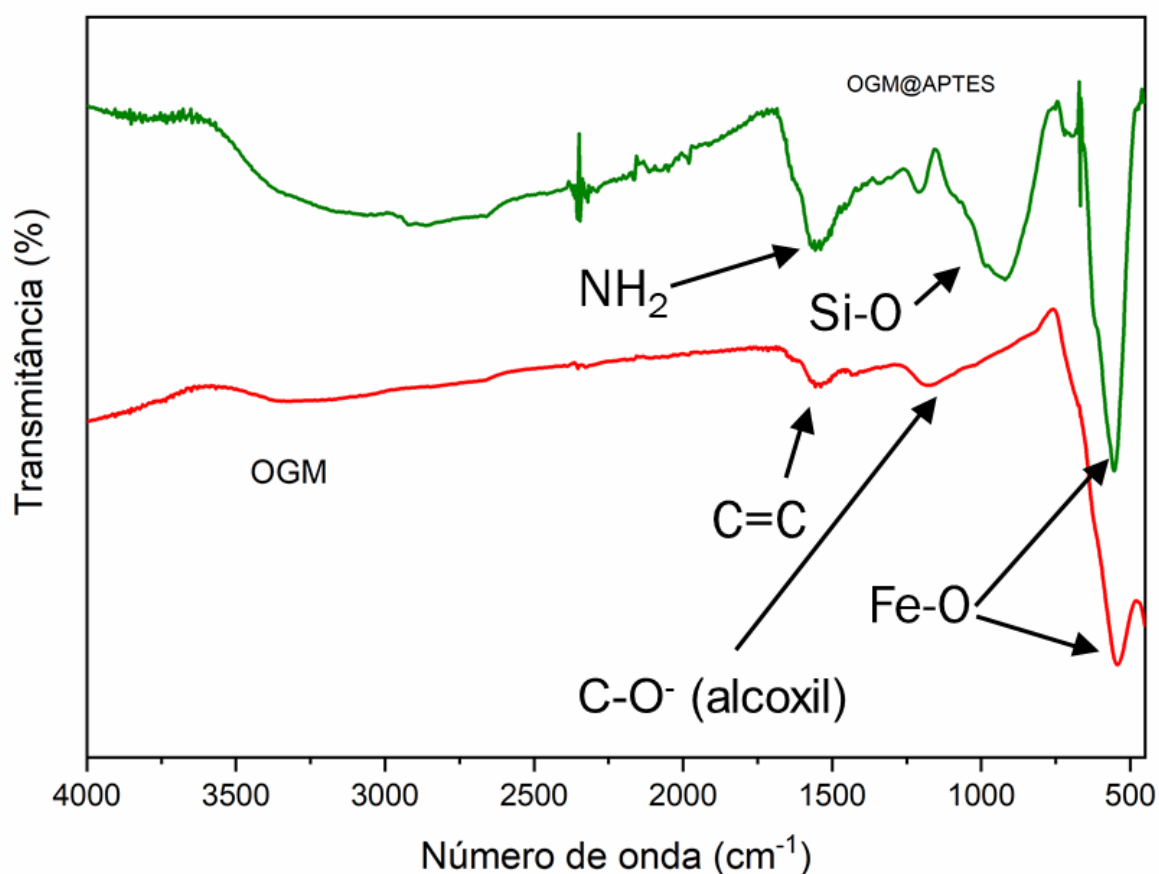
4.2.3 Espectroscopia na região do infravermelho

Para detecção dos principais grupos funcionais presentes nas amostras OGM e OGM@APTES a técnica de espectroscopia na região do infravermelho foi empregada, Figura 27. A amostra contendo OGM apresenta banda em 1620 cm^{-1} (atribuída a C=C, de aromáticos da estrutura das folhas grafeno); a banda em 1224 cm^{-1} (associada ao

grupo C-O⁻ alcoxil); é encontrado em OGM uma banda ~560 cm⁻¹ (relacionada as ligações Fe-O das nanopartículas adicionadas).

A amostra OGM@APTES possui uma banda em 552 cm⁻¹ (também correlacionada pela ligação Fe-O das nanopartículas); diferindo-se da amostra não funcionalizada pela presença de um evento situado próximo a 1000 cm⁻¹ (atribuídas à vibração Si-O); outra banda em 1545 cm⁻¹ (associada ao grupo NH₂), ambas as bandas devido a presença do agente aminosilano utilizado ⁷⁹. Essas bandas de absorção confirmam então que houve, através do método de coprecipitação, o recobrimento da superfície das folhas de óxido de grafeno com nanopartículas de óxido de ferro e com APTES.

Figura 27 - Espectros na região do Infravermelho das amostras OGM e OGM@APTES.

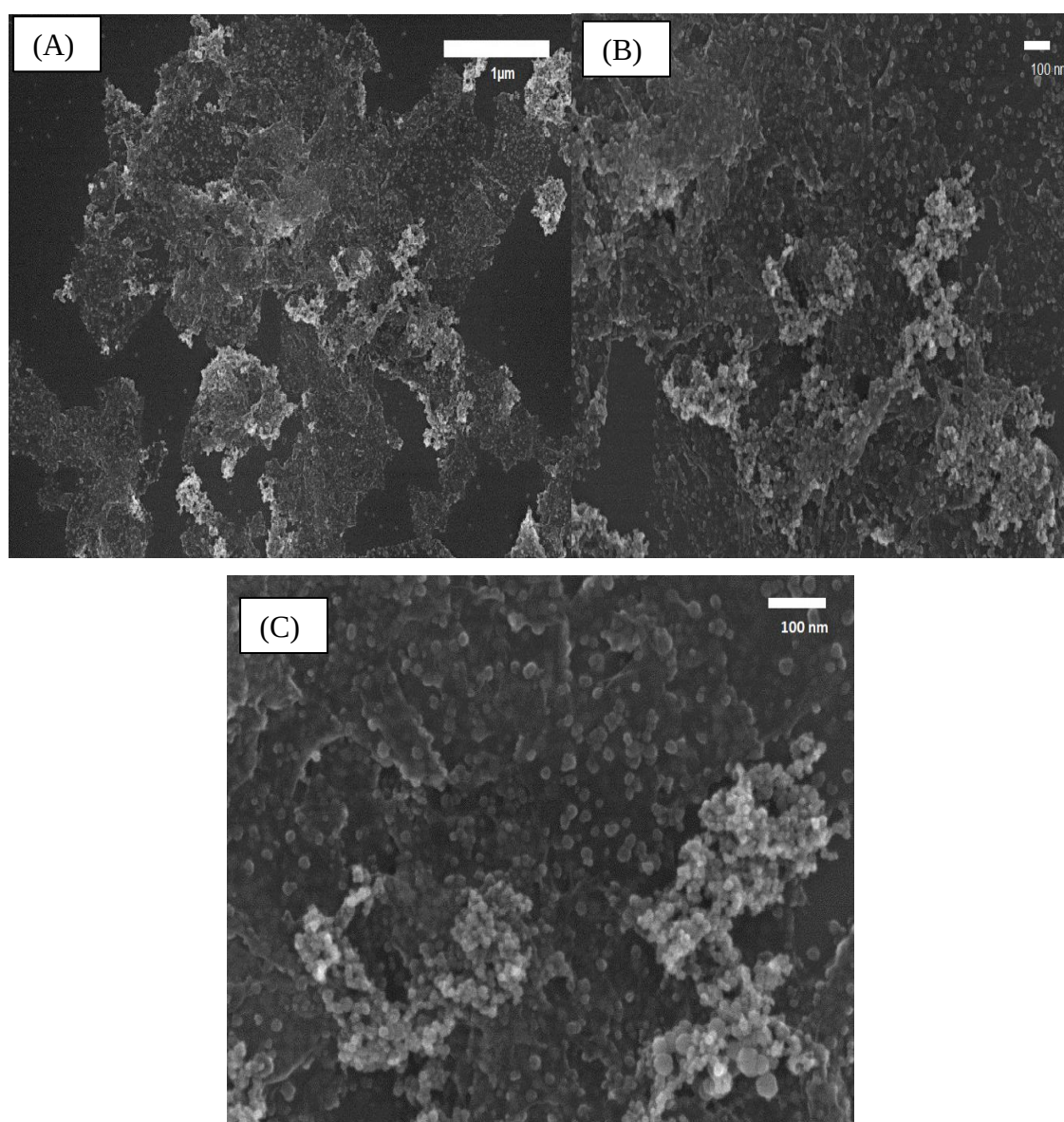


Fonte: Autor

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura

Por meio da técnica de microscopia eletrônica de varredura (Figura 28) foi feito o estudo morfológico das amostras de OGM. É encontrada na amostra a presença de nanopartículas sobre a superfície do grafeno e que, embora o material tenha passado por muitas lavagens essa conformação foi mantida, determinando assim que houve a adição de pequenos núcleos magnéticos (Fe_3O_4) ao longo de toda extensão das folhas. As amostras A, B e C se diferem quanto à magnificação.

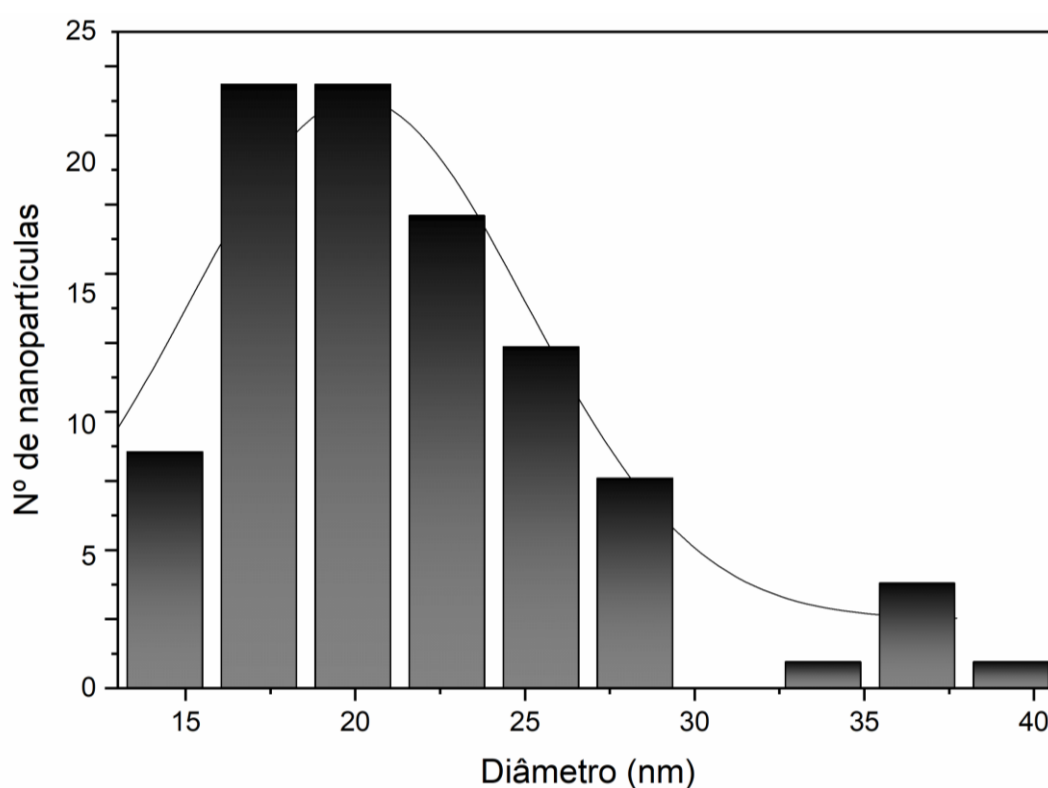
Figura 28 - Microscopia eletrônica de varredura das amostras de OGM. (A) magnificação de 20 mil; (B) 50 mil; (C) 100 mil.



Fonte: Autor.

Foi feito a contagem de 100 nanopartículas presentes nas folhas de óxido de grafeno utilizando o programa ImageJ e o gráfico de distribuição de tamanho de nanopartículas foi feito, Figura 29. Através desse gráfico foi possível determinar que os núcleos das partículas encontradas nas microscopias eletrônicas de varredura têm diâmetro de $20 \pm 5,3$ nm. Isso demonstra a eficiência da utilização de síntese de nanopartículas através de um método simples, como o de coprecipitação, podendo ser empregado em condições ambientes e tendo resultados satisfatórios.

Figura 29 - Relação do número de NP de óxido de ferro com o diâmetro (nm).



Fonte: Elaborado pelo autor

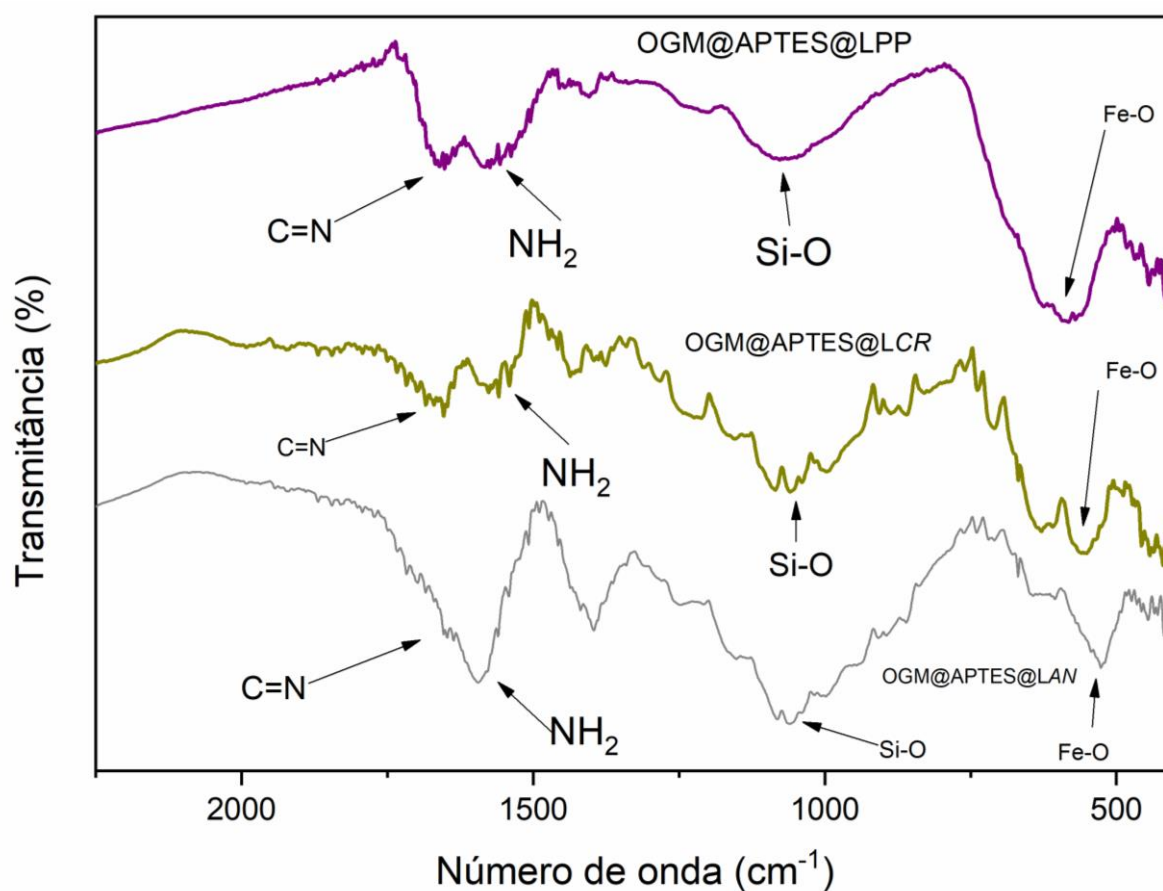
4.3 Imobilização de Lipases

A fim de verificar o potencial do óxido de grafeno magnético como suporte para imobilização de enzimas, o mesmo foi utilizado para imobilizar lipases de diferentes fontes, a saber: pancreática suína (origem animal) e as lipases de *Cândida rugosa* e *Aspergillus niger* (origem fúngica).

4.3.1 Espectroscopia na região do infravermelho

Para confirmar a presença da ligação covalente entre as lipases Pancreática Suína (LPP), Lipase *Candida rugosa* (LCR) e Lipase de *Aspergillus niger* (LAN) no suporte magnético, foi feita a espectroscopia na região do infravermelho, apresentado na Figura 30. Nos espectros dessas amostras são encontradas bandas próximas a 550 cm^{-1} (ligações de Fe-O das nanopartículas); foram observadas também bandas nas regiões de $1690\text{-}1640\text{ cm}^{-1}$, de ligações de iminas, grupo funcional contendo a ligação dupla carbono-nitrogênio, produto da reação de aminas primárias, presentes nas lipases, com o grupo carbonila do aldeído encontrado no agente reticulante glutaraldeído ⁹⁴.

Figura 30 - Espectro na região do Infravermelho Raman das amostras de OGM@APTES@LPP, OGM@APTES@LCR e OGM@APTES@LAN.

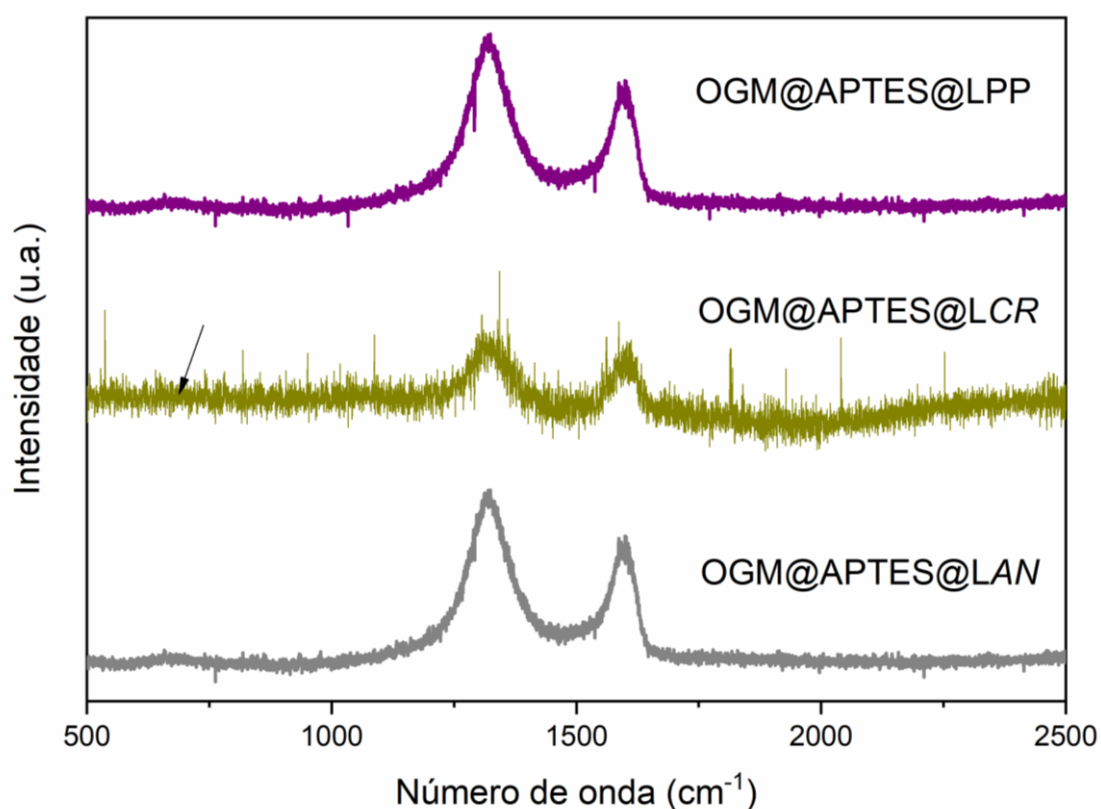


Fonte: Autor.

4.3.2 Espectroscopia Raman

Na última etapa de modificação das folhas de óxido de grafeno a técnica de espectroscopia Raman foi utilizada para confirmar mais uma vez a presença da estrutura carbonácea, apresentado na Figura 31. Foram realizados três processos de imobilização de lipase nas folhas de óxido de grafeno magnético com APTES. Em cada processo foram utilizados lipases diferentes para serem imobilizadas, sendo essas: Lipase Pancreática Suína (LPP), Lipase *Candida rugosa* (LCR) e Lipase de *Aspergillus niger* (LAN). Nos três espectros ainda são encontrados as bandas D (1200 a 1400 cm^{-1}) e G (1500 a 1600 cm^{-1}), características do óxido de grafeno.;

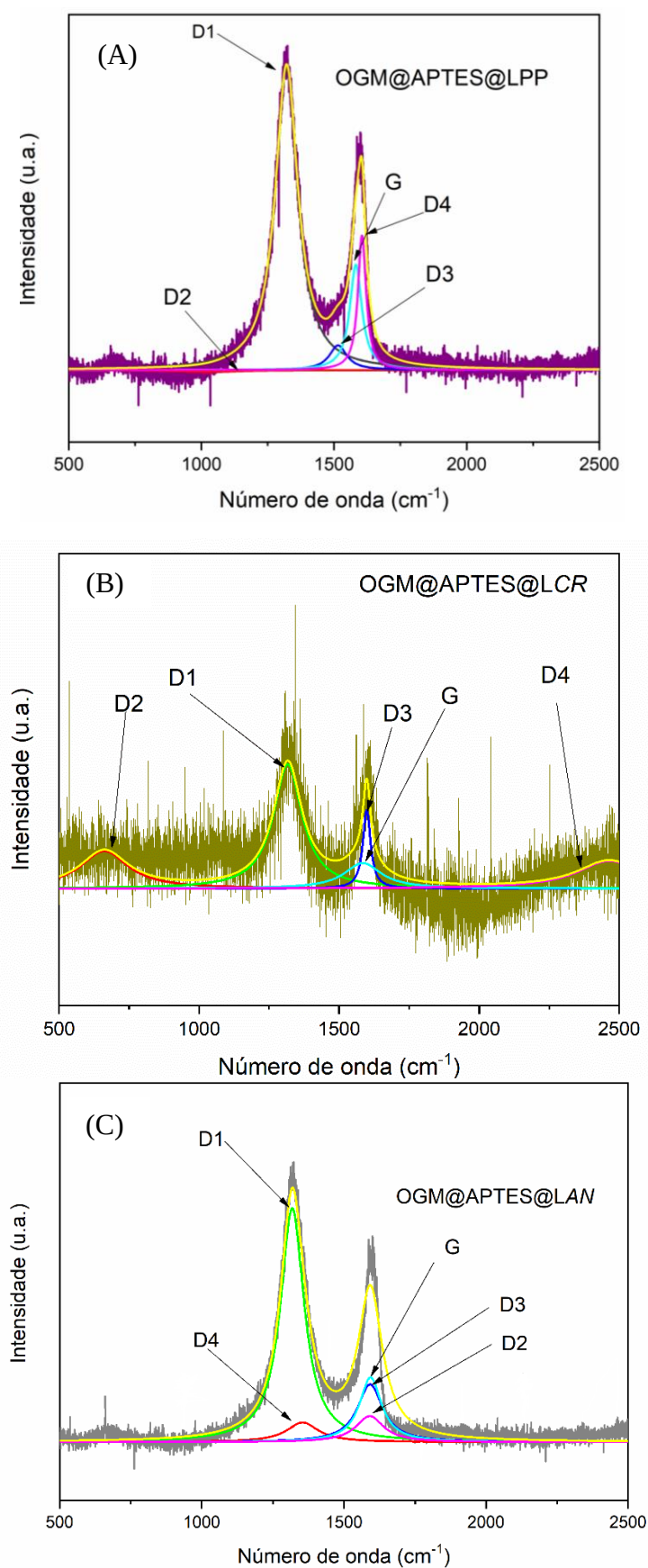
Figura 31 - Espectro Raman das amostras de OGM@APTES@LPP, OGM@APTES@LCR e OGM@APTES@LAN.



Fonte: Autor

Os parâmetros I_D/I_G , para determinação do grau de desordem das três amostras foram feitos com deconvolução dos respectivos espectros, observados na Figura 32.

Figura 32 – Deconvolução dos espectros Raman das amostras (A) OGM@APTES@LPP, (B) OGM@APTES@LCR e (C) OGM@APTES@LAN.



Fonte: Autor

A deconvolução dos espectros, permitiu obter as bandas D1 e G que foram utilizadas para determinar os parâmetros I_D/I_G de cada amostra, Tabela 3.

Tabela 5 - Valores de I_D/I_G das amostras OGM@APTES@LPP, OGM@APTES@LCR, OGM@APTES@LAN.

Amostra	I_D/I_G
OGM@APTES@LPP	1,19
OGM@APTES@LCR	1,18
OGM@APTES@LAN	1,2

Fonte: Autor.

Sendo a imobilização enzimática a última etapa de modificação das folhas de óxido de grafeno, os suportes magnéticos com enzimas imobilizadas possuem o maior grau de desordem de todas as amostras gráficas analisadas e tendo também seus valores de I_D/I_G muito próximos.

4.3.3 Atividade hidrolítica relativa das lipases imobilizadas em OGM@APTES

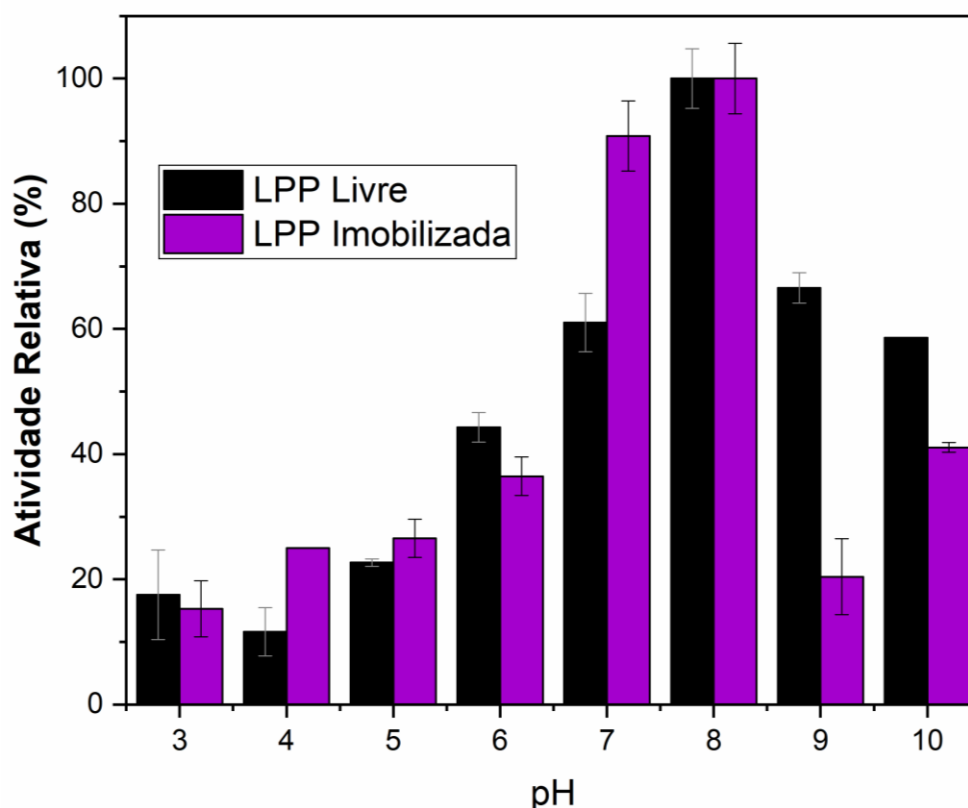
4.3.3.1 Lipase Pancreática Suína

Na Figura 33 têm-se os valores de atividade hidrolítica relativa da lipase de pâncreas de porco (LPP) livre e imobilizada no suporte de OGM, ambas em função do pH. Os ensaios apresentados foram realizados em temperatura fixa de 37°C. As enzimas presentes no suporte apresentaram atividade relativa semelhante com os testes de lipase livre, comprovando que mesmo com o processo de imobilização, através de ligações covalente, o comportamento enzimático é mantido próximo das condições do biocatalisador na forma livre.

É observado nesses resultados que para as duas amostras com a lipase pancreática suína o pH 8 é o ideal para uma atividade mais efetiva, tendo uma forte queda da capacidade catalítica em meios mais ácidos (pH 3 a 5) e em meios mais básicos (pH 9 a 10). Em pH 7 a amostra imobilizada apresentou um comportamento superior se comparada a lipase livre, com uma perda de apenas 10% de atividade do valor máximo obtido. Na indústria farmacêutica, no tratamento de resíduos gordurosos ou produção de biodiesel, por exemplo, os processos químicos requeridos necessitam

de meios muito ácidos ou básicos para que as reações desejadas aconteçam. Tendo em vista então melhorar essa situação, condições mais amenas de meios reacionais, possibilitadas por LPPs imobilizadas e que possuem alta atividade hidrolítica em meios neutros, são vantajosas.

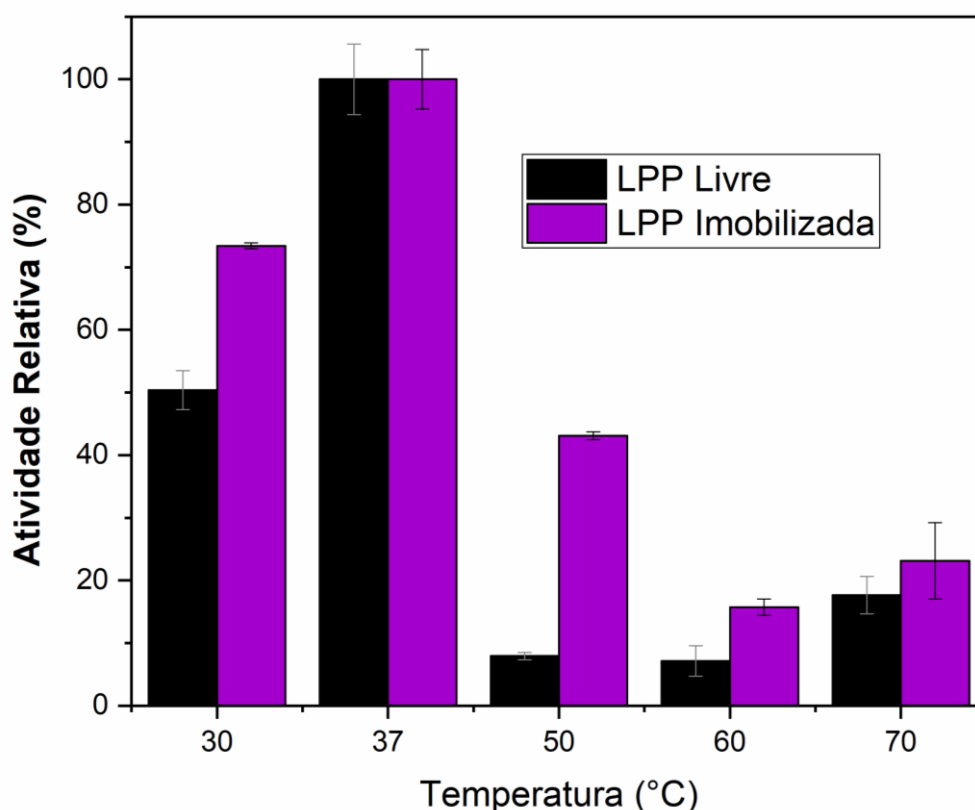
Figura 33 - Atividade catalítica da LPP em função do pH.



Fonte: Autor

Já na Figura 34 faz-se a comparação de atividade enzimática relativa de lipase imobilizada e livre em função da temperatura. A temperatura ótima para ambas enzimas foi em 37°C, como determinado em outros estudos utilizando o mesmo tipo de lipase suína ⁹⁵. É observado a grande perda de poder catalítico com o aumento de temperatura e, por se tratar de um material proteico provindo de um mamífero, sua temperatura ótima encontra-se na faixa de 35 a 40°C, sendo assim mais sensíveis a valores superiores a esse intervalo. Em altas temperaturas, é possível indicar a perda de atividade devido ao rompimento da estrutura tridimensional da lipase, desnaturando-a ⁹⁶.

Figura 34 - Atividade catalítica da LPP em função da temperatura.



Fonte: Autor.

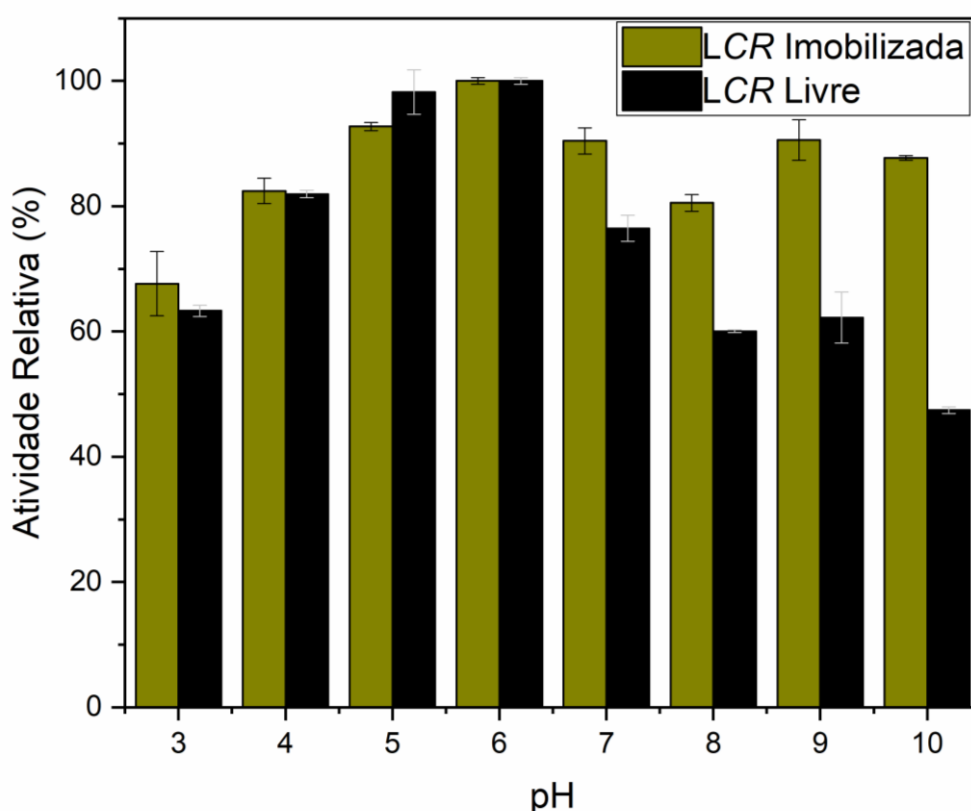
4.3.3.2 Lipase e *Cândida rugosa*

Na Figura 35 é mostrado o gráfico de atividade relativa em função da pH, da Lipase de *Candida rugosa* (LCR) imobilizada no suporte e livre. Para essa análise as amostras também foram mantidas em temperatura fixa de 40°C. O estudo da influência do pH é um parâmetro muito importante a ser estudado, mudanças extremas de pH alteram a estrutura enzimática, reduzindo dessa forma a capacidade catalítica. É observado que o comportamento enzimático da enzima imobilizada é, na maior parte dos valores de pH, superior se comparado com a enzima livre. As duas enzimas apresentaram ótima atividade hidrolítica no pH 6.

A lipase imobilizada apresenta grande estabilidade mesmo com variação do pH reacional, promovida pelas múltiplas ligações químicas entre a enzima e o suporte magnético funcionalizado. A LCR livre em pH mais baixo apresentou atividade hidrolítica muito próxima da lipase imobilizada, devido aos grupos aminos de sua estrutura, que têm natureza levemente básica e que impede mudanças conformacionais em meios ácidos. Já em meios básicos a lipase livre perde

rapidamente sua atividade, pois não está mais protegida ⁹⁷. Através da análise do gráfico construído e de estudos de imobilização de LCR em híbridos de grafeno, é confirmado que o suporte proposto garante uma maior proteção em meios alcalinos a lipase, melhorando assim o comportamento enzimático em valores de pH mais elevados ^{97,48}.

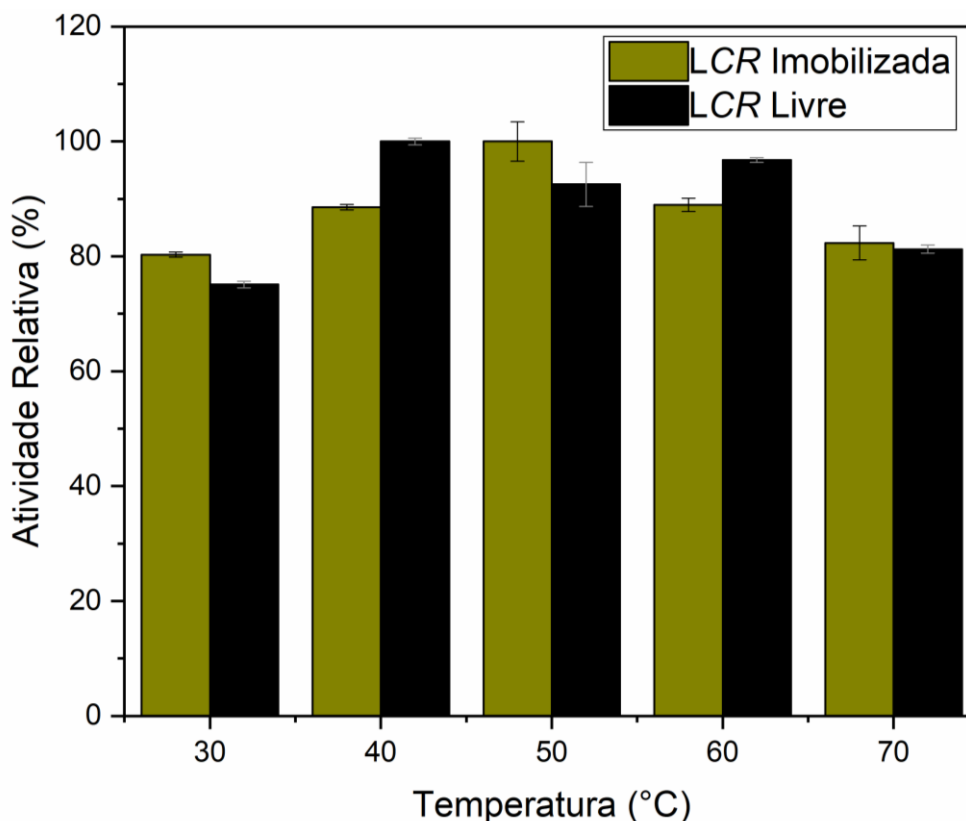
Figura 35 - Atividade catalítica da LCR em função do pH.



Fonte: Autor.

O gráfico mostrado na Figura 36 contém os valores de atividade relativa das LCRs livres e imobilizadas em função da temperatura. Os ensaios foram feitos com o pH fixo em 6, sendo este o pH ótimo para a enzima imobilizada (assim como para a enzima livre, nessa situação). Para essa lipase livre a temperatura de maior atividade hidrolítica foi em 40°C, já para a lipase imobilizada a melhor atividade foi obtida em 50°C. As variações entre as duas amostras ao longo do aumento de temperatura não são tão grandes, demonstrando que a imobilização, nesse caso, mantém o comportamento das enzimas imobilizadas de forma similar ao das enzimas livres.

Figura 36 - Atividade catalítica da LCR em função da temperatura.



Fonte: Autor.

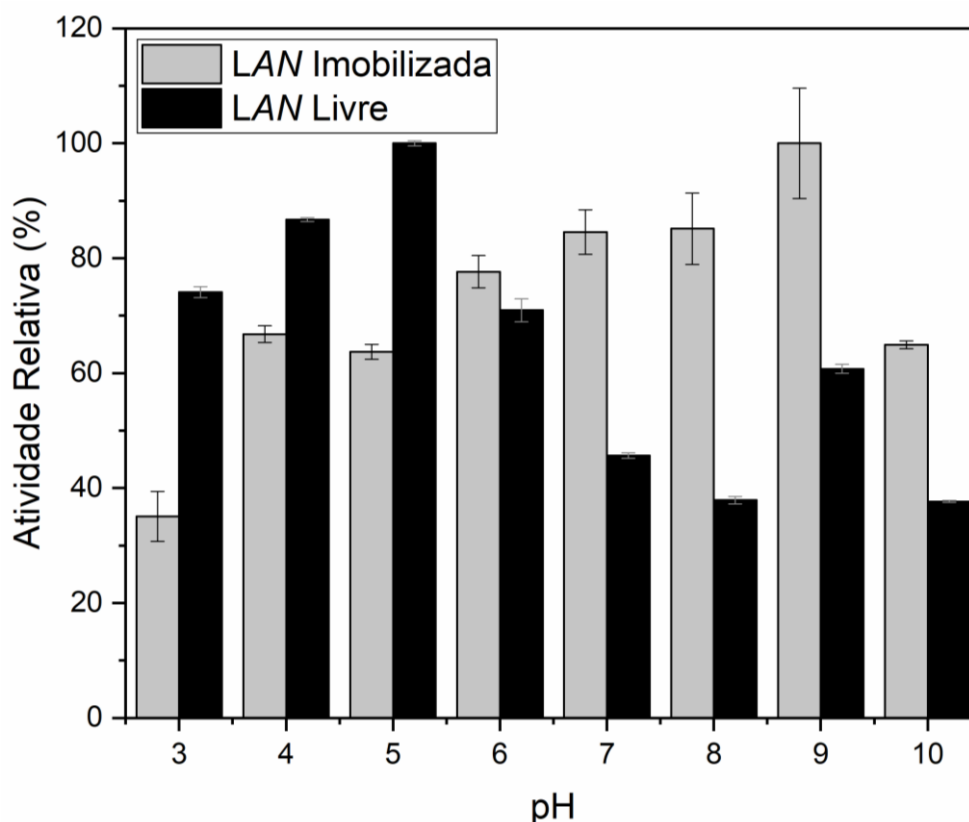
4.3.3.3 Lipase de *Aspergillus niger*

O terceiro ensaio de atividade hidrolítica relativa em função do pH foi realizado na lipase de *Aspergillus niger* (LAN) imobilizada no suporte magnético e livre, Figura 37. As enzimas imobilizadas apresentaram condições ótimas de catálise no pH 9, já as enzimas livres no pH 5. É observado que a imobilização retardou mais uma vez o efeito de desnaturação das LANs com o aumento do valor de pH. Essa característica é analisada também em outros estudos de imobilização de LANs ⁹⁸.

Os melhores comportamentos enzimáticos das lipases livres em meios ácidos podem da mesma forma, se comparado as outras lipases estudadas, ser atribuídos a proteção natural proveniente dos grupos amino presentes em sua estrutura e sendo perdida com o aumento da alcalinidade do meio. Essa maior resistência em valores de pH mais baixo ocorre também devido a origem da enzima, tendo as lipases provenientes do fungo *Aspergillus niger* melhor atividade catalítica do pH 3 ao 6 ⁹⁹. Por outro lado, as enzimas imobilizadas apresentaram uma estabilidade quanto a variação

dos valores de pH ainda maior dos que as livres, mantendo ao menos 60% de atividade relativa do pH 4 ao 10.

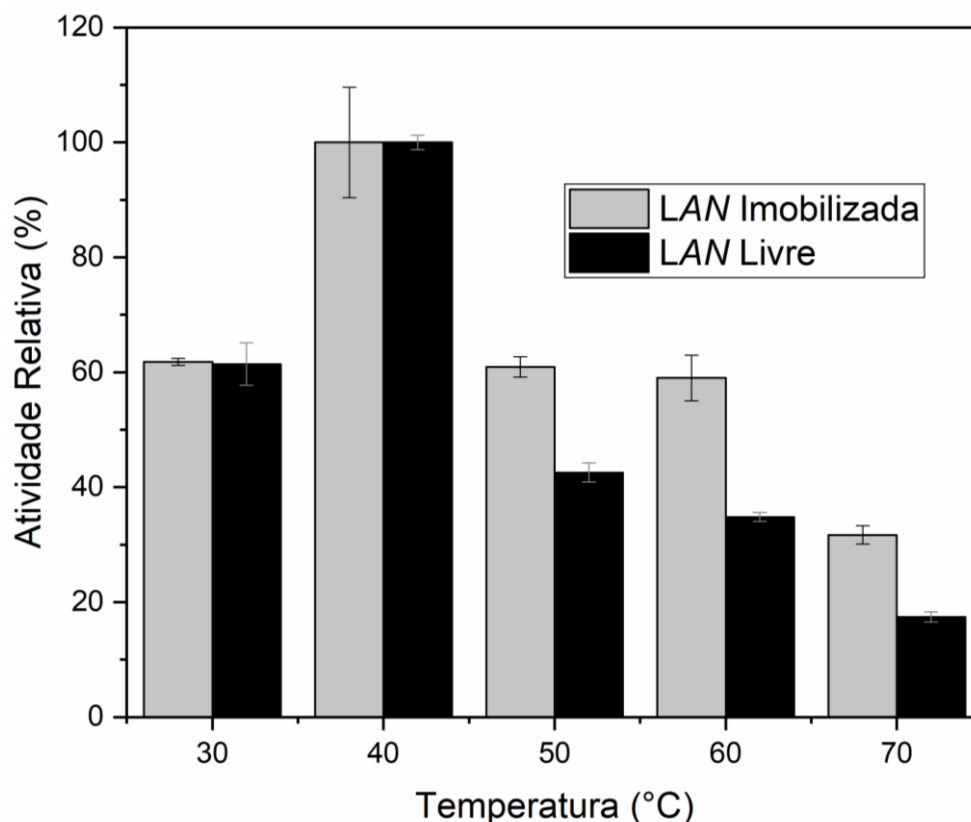
Figura 37 - Atividade catalítica da LAN em função do pH.



Fonte: Autor.

É apresentado na Figura 38 os valores de atividade catalítica das LANs imobilizadas em função da temperatura. A ótima condição de atividade relativa foi dada, para ambas enzimas, na temperatura de 40°C. É observado que o aumento de temperatura diminui drasticamente a atividade das enzimas livres, isso devido as características mesófilas do fungo *Aspergillus niger*. Foi denotado que as lipases imobilizadas mostraram comportamento enzimático superior, tendo em toda faixa de temperatura estudada (30 a 70°C) atividade relativa acima de 30%.

Figura 38 - Atividade catalítica da LAN em função da temperatura.



Fonte: Autor

Na Tabela 6 são apresentados os valores ótimos de pH e temperatura das lipases estudadas, nas formas livres e imobilizadas. A diferença nos valores ótimos obtidos relaciona-se à complexidade do processo de imobilização. Deve-se levar em consideração que a interação suporte/enzima varia de acordo com a espécie de lipase utilizada ^{48,97,95}.

Tabela 6: Valores de pH e temperatura ótima das lipases estudadas.

	LPP livre	LPP Imobilizada	LCR Livre	LCR imobilizada	LAN livre	LAN imobilizada
pH	8	8	6	6	5	9
Temperatura	37	37	40	50	40	40

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Estabilidade operacional

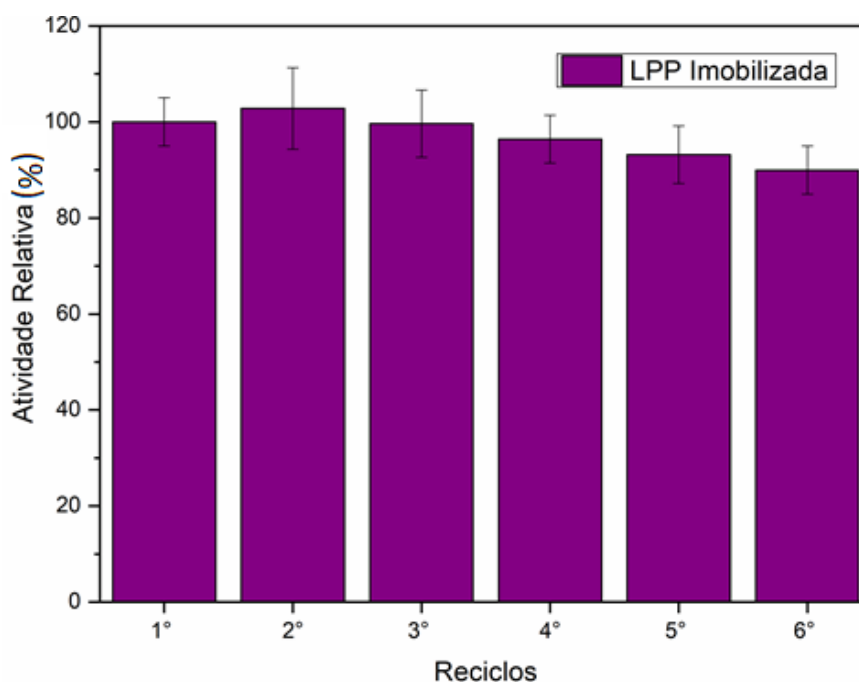
Um dos desafios encontrados para a utilização de lipases livres em processos industriais está na separação das mesmas do meio reacional. Dessa forma, realizou-se a avaliação da estabilidade operacional da lipase imobilizada, através de ciclos consecutivos.

A Figura 39 apresenta a atividade relativa (%) da lipase pancreática (LPP) em função dos ciclos avaliados. Por uma questão de tempo, este estudo foi efetuado apenas para o derivado imobilizado OGM@APTES@LPP. As condições necessárias para que o ensaio de reciclo da amostra OGM@APTES@LPP fosse satisfatório incluem; pH 8, temperatura de 37°C e mínimo de 50mg de enzima imobilizada. Ao longo da tentativa de reciclo, foi possível recuperar seis vezes a enzima suportada sem que houvessem perdas significativas de atividade.

Com o aumento do número de ciclos de reuso do biocatalisador houve a perda gradativa de atividade hidrolítica, sendo a atividade do sexto reciclo 10% menor em comparação com o primeiro. Essa pequena diferença é resultante da imobilização por ligações covalentes entre a lipase e o suporte magnético que impede a dessorção da enzima para o meio reacional. Em processos físicos de imobilização essa diminuição de atividade seria mais acentuada, devido a interação mais fraca entre os dois componentes.

Esses resultados confirmam que após imobilizadas em suporte de óxido de grafeno magnético, as amostras de LPP podem ser facilmente recuperadas com o auxílio de um campo magnético externo e recicladas inúmeras vezes sem uma diminuição expressiva de sua capacidade hidrolítica.

Figura 39 – Reutilização da amostra OGM@APTES@LPP.



Fonte: Autor

A boa solubilidade das lipases é o principal desafio encontrado para sua recuperação do meio reacional, sendo assim, a imobilização dessas enzimas em materiais que facilitem sua separação é fundamental para promover a utilização das mesmas em inúmeros processos produtivos ⁴⁸. Os testes realizados na enzima LPP imobilizada em óxido de grafeno magnético confirmaram o aumento da estabilidade térmica, se comparado com LPPs livres e viabilizaram a reciclagem das mesmas. Estudos complementares devem ser feitos visando obter as condições necessárias para o reciclo de lipases de outras fontes, tais como *Candida rugosa* e *Aspergillus niger*.

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.

6. PERSPECTIVAS

Para melhorar o presente trabalho tem-se como perspectiva a realização dos testes de reciclo enzimático das amostras imobilizadas de lipase de *Candida rugosa* e *Aspergillus niger*. Efetuar ensaios de hipertermia das amostras e avaliar a influência do campo magnético alternado no aquecimento das enzimas suportadas.

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 Depositi. 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, Ayesh 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. **Química 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.