

Viviane Chiaradia

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
POLI(UREIA-URETANO) E APLICAÇÃO COMO SUPORTE NA
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica***

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção do
Grau de Mestre em Engenharia Química.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Sayer

Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Débora de
Oliveira

Coorientadora: Dr^a. Aleksandra Valério

Florianópolis
2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chiaradia, Viviane

Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Poli(ureia-uretano) e Aplicação como Suporte na Imobilização da Lipase B de *Candida antarctica* / Viviane Chiaradia ; orientadora, Claudia Sayer ; coorientadores, Débora de – Florianópolis, SC, 2015

140 p.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referência

1. Engenharia Química. 2. Nanopartículas magnéticas. 3. poli(ureia-uretano). 4. encapsulação. 5. Imobilização. I. Sayer, Claudia. II. Oliveira, Débora. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Viviane Chiaradia

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE
POLI(UREIA-URETANO) E APLICAÇÃO COMO SUPORTE NA
IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica***

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 8 de Junho de 2015.

Prof. Ricardo Antonio Francisco Machado, Dr.
Coordenador do Curso

Prof.^a Claudia Sayer, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Débora de Oliveira, Dr.^a
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Alexsandra Valério, Dr.^a
Coorientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Banca Examinadora:

Prof. Marco Di Luccio, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. José Vladimir de Oliveira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Cristiane da Costa Bresolin, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus queridos familiares e a todos que contribuíram em minha escolha profissional.

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora Claudia Sayer pela oportunidade de desenvolver este trabalho e pela confiança depositada nele. As minhas coorientadoras Débora de Oliveira e Alessandra Valério pela amizade, paciência, incentivo e conhecimento compartilhado. Ao professor Pedro Henrique Hermes de Araújo pela disponibilidade imediata para com o desenvolvimento do trabalho e a preocupação em fazê-lo dar certo.

A todos os professores que passaram pela minha vida e de alguma forma contribuíram para o meu amadurecimento.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pelas análises de MET, MEV-FEG e fluorescência.

Ao Laboratório de Caracterização Magnética de Materiais pelas análises de magnetização.

Aos colegas do Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP), pela amizade e apoio no decorrer do mestrado, em especial aos integrantes do grupo da miniemulsão pelas ideias e risadas compartilhadas em cada encontro.

A aluna de Iniciação Científica Nicole Spillere Soares pela ajuda nos experimentos.

A Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química por todos os recursos disponibilizados.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

Aos meus pais, pela educação exemplar, apoio constante e confiança depositada na nossa família. Sem dúvidas, juntamente com meus irmãos são meu maior orgulho e fonte de todo meu amor!

Ao meu namorado André pela tolerância nos meses finais do mestrado, estando ao meu lado e me acompanhando na correria final.

Obrigada!

RESUMO

Materiais superparamagnéticos encapsulados em matriz polimérica são interessantes em diversos tipos de aplicações, incluindo áreas biomédicas, processos de separação, biotecnologia e imobilização de enzimas. Neste trabalho, nanopartículas superparamagnéticas de poli(ureia-uretano), PUU, foram obtidas via polimerização interfacial em miniemulsão e utilizadas como suporte na imobilização da lipase B de *Candida antarctica*. Nanopartículas de magnetita com comportamento superparamagnético foram obtidas pelo método de co-precipitação e, após a síntese, as nanopartículas magnéticas, NPMs, foram recobertas com ácido oleico, AO, para a obtenção de uma superfície hidrofóbica. A síntese de nanopartículas de PUU foi conduzida utilizando 1,6-hexanodiol como polioli e diisocinato de isoforona, IPDI, como diisocianato. As NPMs-AO foram incorporadas em PUU durante a polimerização interfacial em miniemulsão. Nanopartículas de PUU com NPMs-AO incorporadas foram caracterizadas por Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier, (FTIR), análise termogravimétrica, (TGA), magnetometria de amostra vibrante, (MAV), microscopia eletrônica de transmissão, (MET), e microscopia eletrônica de varredura, (MEV-FEG). Os resultados mostraram alta eficiência de encapsulação e as análises de MAV confirmaram que NPMs-AO apresentam comportamento superparamagnético após a encapsulação. Lipase B de *Candida antarctica* foi imobilizada nas nanopartículas poliméricas magnéticas de PUU, (NPMs PUU), em uma única etapa durante a polimerização interfacial em miniemulsão e o derivado atraído por um campo magnético externo foi utilizado como catalisador em reações de síntese de etil oleato, geranyl oleato e geranyl propionato. O teor de ácidos graxos livres nas amostras, medido pelo método de titulação, mostrou que conversões em ésteres acima de 85% foram obtidas para todos os sistemas estudados. A análise de microscopia óptica de fluorescência mostrou a presença de lipase na superfície das NPMs-PUU, confirmando a formação de ligação entre enzima-suporte. Em um segundo método de imobilização, lipase B de *Candida antarctica* foi imobilizada em NPMs PUU em duas etapas após a polimerização interfacial em miniemulsão, com as partículas liofilizadas. O processo foi realizado pelo contato da enzima com o suporte em tampão fosfato pH 7,6, a solução foi incubada em shaker a 30 °C a 150 rpm e a atividade de esterificação enzimática foi medida. Atividades relativas acima de 85% em relação à enzima livre foram obtidas em uma hora de

imobilização com concentração de enzima de 0,55 mg/mL. Análises de FTIR, MEV-FEG, estabilidade térmica (40, 60 e 80 °C), estabilidade ao pH (4, 7 e 10) e estabilidade ao armazenamento mostraram a eficiência de imobilização da lipase por adsorção em NPMs PUU, que apresentou estabilidade em diferentes condições reacionais.

Palavras-chave: Nanopartículas magnéticas, poli(ureia-uretano), lipase, polimerização em miniemulsão, encapsulação, imobilização.

ABSTRACT

Superparamagnetic materials encapsulated in a polymeric matrix are interesting for several applications, including biomedical, separation process, biotechnology and enzyme immobilization. In this work, superparamagnetic poly(urea-urethane), PUU, nanoparticles were obtained by interfacial miniemulsion polymerization and used as a support for the immobilization of lipase B from *Candida antarctica* (CALB). Magnetite nanoparticles presenting superparamagnetic behavior were obtained by the co-precipitation method and after the synthesis the magnetic nanoparticles, MNPs, were coated with oleic acid, OA, to provide a hydrophobic surface. The synthesis of PUU nanoparticles was performed using 1,6-hexanediol as polyol and isophorone diisocyanate, IPDI, as diisocyanate. The MNPs-OA were incorporated during the interfacial miniemulsion polymerization. PUU with MNPs-OA were characterized by Fourier transform infrared spectroscopy, (FTIR), thermogravimetric analysis, (TGA), electromagnetic vibrating sample magnetometry, (VSM), transmission electron microscopy, (TEM), and scanning electron microscopy, (SEM-FEG). Results showed a high encapsulation efficiency and VSM analysis showed that PUU with MNPs-OA still presented superparamagnetic behavior after the encapsulation step. CALB was immobilized on magnetic poly(urea-urethane) nanoparticles, (MNPs PUU) in a single step during the interfacial miniemulsion polymerization. After the immobilization process, the immobilized enzyme was attracted by an external magnetic field and was used as a catalyst in the synthesis of ethyl oleate, geranyl propionate and geranyl oleate. Ester conversions above 85% were obtained for all systems based on the free fatty acids contents measured by titration. Fluorescence microscopy images confirmed the immobilization of enzyme onto MNPs-PUU. CALB was immobilized on MNPs PUU in two steps after the interfacial polymerization in miniemulsion. Lipase was added to lyophilized particles (MNPs PUU) in phosphate buffer (0.1 M, pH 7.6). The mixture was incubated at 30 °C in a shaker for 30-360 min to determine the time required for maximum immobilization efficiency and the enzyme activity was determined by the esterification reactions between lauric acid and propanol. The relative activities of the immobilized enzyme in relation to free enzyme were above 85% in one hour with 0.55 mg/mL of enzyme in solution. FTIR analysis, SEM-FEG, thermal stability (40, 60 and 80 °C), pH stability (4, 7 e 10) and storage

stability showed the efficiency of the method, that allowed to maintain high stability of the immobilized enzyme under different conditions.

Keywords: Magnetic nanoparticles, poly(urea-urethane), lipase, miniemulsion polymerization, encapsulation, immobilization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura cristalina da magnetita.	32
Figura 2 - Curvas de histerese (magnetização em função do campo aplicado) características de NPs ferromagnéticas, diamagnéticas, paramagnéticas e superparamagnéticas e valores de remanescência, M_r , e campo coercivo, H_c	34
Figura 3 - Transição de multi-domínio para domínio único em nanopartículas magnéticas como uma função do raio.	35
Figura 4 - Tipos de arranjos entre NPMs e polímeros, moléculas e partículas inorgânicas.	37
Figura 5 - Aplicações biomédicas e biotecnológicas de NPMs.	39
Figura 6 - Sistemas de entrega de fármacos com NPMs.	40
Figura 7 - Micrografias de MEV e MET (canto superior direito) das nanocápsulas de PCM (a) sem material magnético e (b) com material magnético.	43
Figura 8 - Reação de formação de poliuretano pela reação entre poliálcool e diisocianato.	44
Figura 9 - Reação de formação de ligações ureia.	44
Figura 10 - Síntese de NPMs encapsuladas em polímero via polimerização em miniemulsão.	47
Figura 11 - Métodos de imobilização de enzima em suporte.	52
Figura 12 - Representação esquemática da síntese das NPMs revestidas com ácido oleico.	64
Figura 13 - Encapsulação das NPMs-AO (adicionadas durante a sonicação) via polimerização interfacial em miniemulsão.	65
Figura 14 - Encapsulação das NPMs-AO (adicionadas antes da sonicação) via polimerização interfacial em miniemulsão.	66
Figura 15 - Micrografias de MET das NPMs revestidas com AO.	69
Figura 16 - Distribuição dos tamanhos de partícula NPMs-AO, baseado nas micrografias de MET (<i>figura superior direito</i>).	70
Figura 17 - Análise termogravimétrica das NPMs-AO.	71
Figura 18 - Espectro de FTIR das NPMs recobertas com ácido oleico.	72
Figura 19 - Interação bidentada-quelante entre o grupo COO- do AO e o átomo de metal Fe.	73
Figura 20 - Curva de magnetização das NPMs-AO.	74
Figura 21 - NPMs-AO em etanol sem a aplicação de um campo magnético externo e com a aplicação de um campo magnético externo.	75
Figura 22 - Micrografia de MET das NPs de PUU.	76
Figura 23 - Análise termogravimétrica das NPs de PUU.	77

Figura 24 - Espectro de FTIR das NPs de PUU (reação M0).	78
Figura 25 - Análise termogravimétrica da reação M3 (NPMs-AO adicionadas durante a sonicação e antes da sonicação).....	79
Figura 26 - Espectro de FTIR das NPs de PUU com 5% de NPMs-AO em massa (em relação ao IPDI), (reação M2).....	81
Figura 27 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 5% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI (reação M2).	82
Figura 28 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 10% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI (reação M3).	82
Figura 29 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 10% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI e 17% de Crodamol (reação M4).....	83
Figura 30 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 30% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI e 17% de Crodamol (reação M5).....	83
Figura 31 - Micrografias de MEV-FEG das NPs magnéticas de PUU com 10% de Fe ₃ O ₄ (reação M4) com barra de tamanhos de 100 nm (figura a esquerda) e 1000 nm (figura a direita).....	84
Figura 32 - PUU com 5%, 10% e 30% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI.	85
Figura 33 - Distribuição do tamanho de partícula, baseado nas micrografias de MET (reação M4) (<i>figura canto superior direito</i>).	87
Figura 34 - Distribuição do tamanho de partícula, baseado nas micrografias de MET (reação M5) (<i>figura canto superior direito</i>).	87
Figura 35 - Curva de magnetização das NPs de PUU com 10% de NPMs-AO (reação M4/NPMs-AO adicionadas antes da sonicação)....	89
Figura 36 - PUU com 10% de NPMs-AO em água sem a aplicação de um campo magnético externo e com a aplicação de um campo magnético externo.	89
Figura 37 - Representação esquemática da imobilização da lipase CALB em NPs magnéticas de PUU.	94
Figura 38 - Processo de imobilização da lipase CALB em NPMs-AO.	96
Figura 39 - Representação esquemática da remoção das lipases imobilizadas em NPMs-AO para aplicação em reações de esterificação.	96
Figura 40 - Medida de atividade da lipase CALB em PUU-NPMs.	99
Figura 41 - Morfologia das nanopartículas magnéticas de PUU com lipase CALB após polimerização interfacial em miniemulsão.	103
Figura 42 - Tempo de imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU com diferentes concentrações de Fe ₃ O ₄ e 0,55 mg/mL de enzima em solução tampão fosfato.....	108

Figura 43 - Tempo de imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU com diferentes concentrações de Fe_3O_4 e 2 mg/mL de enzima em solução tampão fosfato.....	109
Figura 44 - Lipase CALB imobilizada em NPMs de PUU em solução tampão fosfato sem a aplicação de um campo magnético externo e com a aplicação de um campo magnético externo.....	110
Figura 45 - Espectro de FTIR da (a) CALB livre e (b) 2 mg/mL de CALB imobilizada em NPs de PUU com 10% de NPMs-AO em massa (em relação ao IPDI).	111
Figura 46 - Micrografias de MEV-FEG das NPs magnéticas de PUU com 5% de Fe_3O_4 e 2 mgE/mL (condição A4) com barra de tamanhos de 100 nm (figura à esquerda) e 1000 nm (figura à direita).....	113
Figura 47 - Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a 40 °C.	114
Figura 48 - Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a 60 °C.	114
Figura 49 - Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a 80 °C.	115
Figura 50 - Estabilidade em pH 4 da enzima livre e imobilizada a 30 °C.	116
Figura 51 - Estabilidade em pH 7 da enzima livre e imobilizada a 30 °C.	117
Figura 52 - Estabilidade em pH 10 da enzima livre e imobilizada a 30 °C.	117
Figura 53 - Estabilidade ao armazenamento a 4 °C da enzima imobilizada.....	119

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Formulações das reações de miniemulsão. *	64
Tabela 2 - Diâmetros médios e PdI das NPMs-AO.....	70
Tabela 3 - Propriedades magnéticas das NPMs-AO.	74
Tabela 4 - Diâmetro médio em intensidade das gotas (Dg) e das partículas (Dp) de PUU puro e índice de polidispersão (PdI) medidos por DLS.....	75
Tabela 5 - Diâmetros médios em intensidade das gotas (Dg) e das partículas (Dp) de PUU em diferentes concentrações de NPMs-AO e índice de polidispersão (PdI) medidos por DLS.....	85
Tabela 6 - Diâmetro médio de partícula numérico e em massa e PdI (obtidos por TEM) das reações M4 e M5.....	86
Tabela 7 - Propriedades magnéticas das NPs de PUU com 10% em massa (em relação ao IPDI) de NPMs-AO (reação M4)*.....	88
Tabela 8 - Formulações utilizadas nas reações de miniemulsão. *	94
Tabela 9 - Condições de imobilização das NPMs de PUU e lipase CALB.....	95
Tabela 10 - Diâmetros médios em intensidade das gotas (Dg), diâmetros médios em intensidade das nanopartículas (Dp) magnéticas de PUU com CALB imobilizada e índice de polidispersão (PdI) medidos por DLS.....	103
Tabela 11 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de etil oleato a 50° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 4 horas reacionais.....	104
Tabela 12 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de etil oleato com substrato adicionado em etapas a 50° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 4 horas reacionais.....	105
Tabela 13 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de geranyl oleato a 40° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 6 horas reacionais.....	105
Tabela 14 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de geranyl propionato a 40° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 6 horas reacionais.....	106

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA - Aminoácidos
AO - Ácido oleico
AR - Atividade relativa
CALB - Lipase B de *Candida antarctica*
DRX - Difração de Raios-X
DLS - *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento dinâmico de luz)
FTIR - Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier
IPDI - Diisocianato de isoforona
MAV - Magnetometria de Amostra Vibrante
MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV- FEG - Microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo
MRI - *Magnetic resonance imaging* (ressonância magnética por imagem)
NCO - Isocianato
NPs - Nanopartículas poliméricas
NPMs - Nanopartículas magnéticas
NPMs-AO - Nanopartículas magnéticas recobertas com ácido oleico
NPMs- Fe₃O₄ - Nanopartículas magnéticas de magnetita
OH - Hidroxila
PdI - Índice de polidispersão
PU - Poliuretano
PUU - Poli(ureia-uretano)
rc - raio crítico
rpm - Rotações por minuto
SDS - Dodecil sulfato de sódio
T - Temperatura de reação (° C)
TGA - Termogravimetria

LISTA DE SÍMBOLOS

A - Índice de acidez
A (U/g) - Unidade de atividade enzimática
 A_0 - Índice de acidez inicial
 A_f - Índice de acidez final
Dg - Diâmetro médio em intensidade das gotas (nm)
Di - Diâmetro de partícula (nm)
Dp - Diâmetro médio em intensidade das partículas (nm)
 Dp_n - Diâmetro médio numérico das partículas (nm)
 Dp_v - Diâmetro médio mássico
 α - Fe - Ferrita
 $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ - Cloreto férrico
 Fe_2O_3 - Hematita
 γ - Fe_2O_3 - Maghemita
 Fe_3O_4 - Magnetita
 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ - Sulfato ferroso
H - Campo magnético
 H_c - Coercitividade
K - Kelvin
kDa - kilodalton
kV - quilovolt
 M - Magnetização
 M_s - Magnetização de saturação
 M_r - Magnetização remanescente
 M_r/M_s - Razão de perpendicularidade
 NH_4OH - Hidróxido de amônio
pI - Ponto isoelétrico
 T_c - Temperatura de Curie
U/g - Consumo de 1 μ mol de ácido em um minuto
X - Conversão
 X_{AGL} - Conversão em ácidos graxos livres
 χ - Susceptibilidade magnética

SUMÁRIO

CAPÍTULO I.....	27
1 INTRODUÇÃO.....	27
1.1 OBJETIVOS.....	28
1.1.1 Objetivo geral.....	29
1.1.2 Objetivos específicos.....	29
CAPÍTULO II.....	31
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	31
2.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	31
2.1.1 Óxidos de ferro.....	32
2.1.2 Propriedades magnéticas.....	33
2.1.3 Métodos de obtenção de NPMs.....	36
2.1.4 Modificação de superfície de NPMs.....	36
2.1.5 Aplicações de NPMs.....	38
2.2 ENCAPSULAÇÃO DE NPMs EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS.....	41
2.2.1 Encapsulação <i>in situ</i> de NPMs em polímeros.....	42
2.2.2 Nanopartículas de poli(ureia-uretano).....	43
2.2.3 Síntese de NPs de PUU.....	45
2.2.4 Reações de polimerização em miniemulsão.....	45
2.2.5 Encapsulação de NPMs em NPs poliméricas via polimerização em miniemulsão.....	47
2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NPs POLIMÉRICAS MAGNÉTICAS.....	48
2.3.1 Enzimas.....	49
2.3.2 Lipases.....	50
2.3.3 Lipase de <i>Candida antarctica</i> do tipo B (CALB).....	51
2.3.4 Imobilização de lipases.....	52
2.3.4.1 Imobilização de enzimas por adsorção.....	53

2.3.4.2 Imobilização de enzimas por ligação covalente.....	53
2.3.4.3 Reticulação.....	54
2.3.4.4 Encapsulação.....	55
2.3.4.5 Aprisionamento.....	55
2.3.5 Suportes para imobilização de enzimas.....	56
2.3.5.1 Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas.....	56
2.3.5.2 Imobilização de enzimas em nanopartículas poliméricas.....	57
2.3.6 Aplicação de lipases imobilizadas em síntese de ésteres.....	58
2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	59
CAPÍTULO III.....	61
3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE POLI(UREIA-URETANO) VIA POLIMERIZAÇÃO INTERFACIAL EM MINIEMULSÃO.....	61
3.1 INTRODUÇÃO.....	61
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	62
3.2.1 Materiais.....	62
3.2.2 Métodos.....	63
3.2.2.1 Síntese das nanopartículas de magnetita.....	63
3.2.2.2 Modificação da superfície das nanopartículas de Fe ₃ O ₄	63
3.2.2.3 Encapsulação das NPMs em nanopartículas de poli(ureia-uretano) via polimerização em miniemulsão.....	64
3.2.3 Caracterização.....	66
3.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....	66
3.2.3.2 Decomposição térmica.....	67
3.2.3.3 Propriedades magnéticas.....	67
3.2.3.4 Morfologia e tamanho de partícula.....	67
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
3.3.1 Síntese das NPMs funcionalizadas com ácido oleico.....	69
3.3.1.1 Morfologia e tamanho de partícula.....	69
3.3.1.2 Comportamento térmico.....	70

3.3.1.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	71
3.3.1.4 Propriedades magnéticas.....	73
3.3.2 Síntese das nanopartículas de poli(ureia-uretano).....	75
3.3.2.1 Comportamento térmico do PUU.....	76
3.3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	77
3.3.3 Encapsulação das NPMs-AO em PUU por polimerização interfacial em etapas via miniemulsão.....	78
3.3.3.1 Comportamento térmico.....	79
3.3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	80
3.3.3.3 Tamanho e morfologia das partículas de PUU com NPMs-AO.....	81
3.3.3.4 Propriedades magnéticas.....	88
3.4 CONCLUSÕES.....	90
3.5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	90
CAPÍTULO IV.....	91
4. IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE <i>Candida antarctica</i> EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE POLI (UREIA-URETANO).....	91
4.1 INTRODUÇÃO.....	91
4.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	92
4.2.1 Materiais.....	92
4.2.2 Métodos.....	93
4.2.2.1 Purificação da lipase B de <i>Candida antarctica</i>	93
4.2.2.2 Imobilização da lipase CALB em NPs magnéticas de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão em uma etapa.....	93
4.2.2.3 Imobilização da lipase CALB em NPs magnéticas de PUU em duas etapas.....	95
4.2.2.4 Aplicação da lipase CALB imobilizada em NPMs de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão em uma etapa.....	96

4.2.2.5 Determinação da atividade enzimática da lipase CALB imobilizada em NPs de PUU com Fe ₃ O ₄ em duas etapas.....	98
4.2.3 Caracterização do derivado enzimático.....	100
4.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier.....	100
4.2.3.2 Morfologia da lipase CALB imobilizada em NPMs de PUU e tamanho de partícula.....	100
4.2.3.3 Estabilidade da enzima imobilizada ao armazenamento.....	101
4.2.3.4 Estabilidade ao pH.....	101
4.2.3.5 Estabilidade à temperatura.....	101
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	102
4.3.1 Imobilização de lipase CALB em NPMs de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão.....	102
4.3.1.1 Morfologia das NPMs de PUU com lipase CALB imobilizada.....	102
4.3.1.2 Aplicação da lipase imobilizada em reações de síntese orgânica.....	104
4.3.2 Imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU em duas etapas....	106
4.3.2.1 Estudo da influência de material magnético no suporte e concentração de enzima.....	107
4.3.2.2 Caracterização da enzima imobilizada por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	111
4.3.2.3 Morfologia das NPMs de PUU com lipase CALB imobilizada em duas etapas.....	112
4.3.2.4 Estabilidade térmica.....	113
4.3.2.5 Estabilidade ao pH.....	116
4.3.2.6 Estabilidade ao armazenamento.....	118
4.4 CONCLUSÕES.....	119
4.5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	121
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	123
REFERÊNCIA.....	125

CAPÍTULO I

1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas magnéticas, NPMs, apresentam diversos tipos de aplicações nas mais variadas áreas, entre elas área médica (SINGH e SAHOO, 2014), incluindo a ressonância magnética por imagem (MRI) (SHOKROLLAHI, 2013), sistemas de liberação de fármacos (ARRUEBO et al., 2007), agentes de contraste (WEISSLEDER et al., 1995; CHOULY et al., 1996), hipertermia (CHAN et al., 1993) e áreas biotecnológicas, com aplicações em processos de separação de substâncias e imobilização de enzimas (SUN et al., 2008; YONG et al., 2008; XIE e MA, 2009; JORDAN et al., 2011; WANG et al., 2014). Magnetita, Fe_3O_4 , é um dos óxidos de ferro mais utilizados na síntese de materiais magnéticos e em diâmetros inferiores a 20 nm apresenta comportamento superparamagnético (SUN e ZENG, 2002; LANDFESTER, 2003).

Com o revestimento adequado, as NPMs não sofrem aglomeração e podem ser dispersas em diferentes soluções, o que permite sua aplicação sem a formação de agregados (SUN e ZENG, 2002). A incorporação de NPMs em partículas poliméricas tem ganhado bastante atenção, uma vez que o material polimérico garante maior estabilidade às NPMs, protegendo a sua superfície e garantindo seu comportamento superparamagnético (LANDFESTER e WEISS, 2010).

Um grande número de estratégias para a preparação de NPMs encapsuladas em polímero vem sendo utilizado por pesquisadores, entre elas polimerização em emulsão convencional, polimerização em emulsão inversa, polimerização em microemulsão inversa, polimerização em miniemulsão, polimerização em dispersão, polimerização em precipitação e diversas outras (LU e FORCADA, 2006), mas a maioria delas relata a encapsulação de material magnético por polimerização em cadeia, via radicais livres, com a utilização de iniciadores que se dissociam no meio reacional para a formação das partículas poliméricas.

Desta forma, polímeros obtidos por polimerização em etapas são um potencial a ser explorado na encapsulação de NPMs, uma vez que não há relatos na literatura acerca do assunto. Nanopartículas de poli(ureia-uretano), PUU, já foram estudadas como possíveis sistemas para a liberação controlada de fármacos (VALÉRIO et al., 2014, 2015; GENTILE et al., 2015) e na imobilização de enzimas (CIPOLATTI et

al., 2014), sendo assim a incorporação de material magnético a estas nanopartículas, NPs, agregaria maior valor às propriedades finais das NPs formadas.

A imobilização de enzimas em materiais magnéticos é um método simples e efetivo, pois a recuperação do derivado imobilizado pode ser feita com a aplicação de um campo magnético externo e a elevada área superficial dos materiais permite a imobilização de uma grande quantidade de enzima por unidade de superfície. Inúmeros métodos de imobilização podem ser conduzidos, entre eles destacam-se os métodos através de ligação covalente e a adsorção física entre o suporte e a enzima (KUO et al., 2012).

A imobilização de lipases, como a lipase B de *Candida antarctica*, CALB, já foi reportada anteriormente na literatura, mas apenas em casos de funcionalização da superfície das NPMs com polímeros, permitindo a ligação enzima-suporte (YONG et al., 2008; NETTO et al., 2009; KUO et al., 2012), ou em partículas de polímeros puras (MILETIĆ et al., 2010; CIPOLATTI et al., 2014).

Um dos poucos trabalhos relatando a imobilização em materiais poliméricos com material magnético incorporado nas partículas foi realizado por Wang e colaboradores (2014). Os autores relataram a imobilização reversível de glucoamilase em esferas de poliestireno magnéticas contendo multigrupos funcionais. Para tal, microesferas de poliestireno foram sintetizadas por polimerização em dispersão e após funcionalizadas com diferentes grupos reativos. Em seguida, as partículas magnéticas foram impregnadas no polímero por um método de co-precipitação modificado, resultando em partículas com diâmetro de 1,8 μm e a imobilização foi realizada. Além das partículas não apresentarem tamanho nanométrico, as NPMs foram incorporadas na superfície das microesferas, desta forma o material polimérico não atua como protetor contra a agregação. Acerca disso, não há trabalhos na literatura que apresentem a imobilização de CALB em matrizes poliméricas com material magnético encapsulado.

Dentro deste contexto, a utilização de NPs poliméricas com material magnético encapsulado apresenta-se como uma alternativa viável para a imobilização de enzimas, uma vez que o revestimento polimérico além de proteger as NPMs contra a agregação possui diferentes grupos funcionais em sua superfície que poderão reagir com a superfície do catalisador. No caso de nanopartículas de poli(ureia-uretano) o diisocianato livre na superfície pode se ligar aos grupamentos presentes na superfície de lipases.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Com base no exposto, este trabalho teve como principal objetivo estudar a encapsulação de nanopartículas de magnetita em nanopartículas poliméricas de poli(ureia-uretano) via polimerização interfacial em miniemulsão e a utilização destas nanopartículas poliméricas magnéticas na imobilização da lipase B de *Candida antarctica* por meio de diferentes métodos.

1.1.2 Objetivos específicos

- 1 - Síntese e caracterização de nanopartículas de magnetita (NPMs de Fe_3O_4).
- 2 - Encapsulação de NPMs de Fe_3O_4 em PUU via polimerização interfacial em miniemulsão e caracterização do material obtido.
- 3 - Imobilização da lipase B de *Candida antarctica*, CALB, pelo processo de imobilização em uma única etapa via ligação covalente, durante a síntese das nanopartículas magnéticas de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão e caracterização do derivado obtido.
- 4 - Aplicação da lipase imobilizada em uma única etapa em reações de síntese de ésteres.
- 5 - Imobilização da CALB pelo processo de imobilização em duas etapas via adsorção física após a síntese das nanopartículas magnéticas de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão e caracterização do derivado obtido.
- 6 - Caracterização da enzima livre e imobilizada em duas etapas em relação à estabilidade térmica (40, 60 e 80 °C), estabilidade ao pH (4, 7 e 10) e ao armazenamento.

Este trabalho foi dividido em quatro capítulos, sendo uma breve introdução com os objetivos desta dissertação de mestrado apresentada no Capítulo 1. O Capítulo 2 traz a fundamentação teórica necessária para o desenvolvimento do trabalho, apresentando as características de materiais magnéticos e poliméricos e as principais técnicas de encapsulação de nanopartículas magnéticas, NPMs, em nanopartículas poliméricas e sua utilização como suporte em sistemas de imobilização de enzimas. O Capítulo 3 apresenta os estudos de síntese de nanopartículas magnéticas de poli(ureia-uretano) e a caracterização dos materiais obtidos, enquanto que o Capítulo 4 apresenta o estudo destas

nanopartículas como suporte na imobilização da lipase B de *Candida antarctica*. No Capítulo 5 são relatadas as conclusões gerais.

CAPÍTULO II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O presente capítulo tem como interesse aprofundar os principais assuntos relacionados ao trabalho e sua relevância na literatura. Primeiramente serão relatadas a importância e as aplicações de nanopartículas magnéticas e suas principais propriedades, destacando-se o superparamagnetismo. Em seguida será apresentada a importância da encapsulação de materiais magnéticos em nanopartículas poliméricas para posterior uso como suporte na imobilização de enzimas, abordando desta forma os principais métodos de imobilização de enzimas descritos na literatura.

2.1 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Nanopartículas magnéticas (NPMs) apresentam como uma de suas principais propriedades o superparamagnetismo, propriedade na qual partículas com diâmetro de até 20 nm apresentam um único domínio magnético quando aplicado um campo magnético externo. Esta capacidade em manter os polos magnéticos numa determinada posição é denominada coercitividade, em partículas magnéticas maiores que 20 nm os domínios magnéticos se alinham em vários sentidos (AKBARZADEH et al., 2012).

Dentre os diversos tipos de sistemas nanoparticulados, um dos mais utilizados são as NPMs de óxido de ferro. Suas propriedades, aliadas a sua baixa toxicidade as tornam apropriadas para inúmeras aplicações como: sistemas de liberação de fármacos (SUN e ZENG, 2002), biossensores, ressonância magnética (WEISSLEDER et al., 1995; CHOULY et al., 1996), hipertermia (CHAN et al., 1993) e agentes de contraste para aplicações biomédicas.

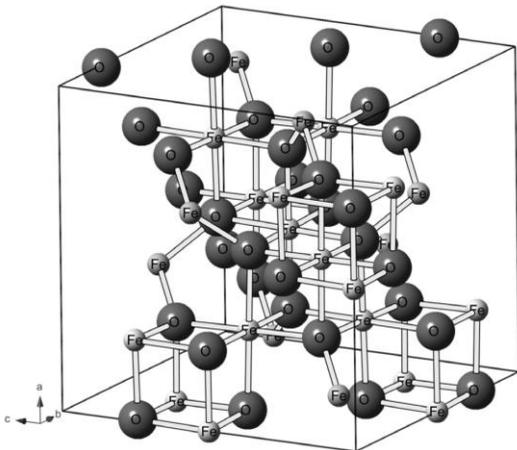
Além disto, pesquisas na área de biotecnologia mostraram a alta resposta magnética de NPMs contendo enzimas e proteínas quando um campo magnético externo é utilizado. Desta forma, NPMs podem ser aplicadas para separação magnética de várias substâncias na biocatálise (GAWANDE et al., 2014) e como suportes na imobilização de enzimas (XIE e MA, 2009; ATACAN e ÖZACAR, 2015).

2.1.1 Óxidos de ferro

Os diferentes tipos de óxidos de ferro são classificados de acordo com o estado de valência do ferro na estrutura cristalina. Dentre eles, destacam-se a wustita, FeO , que possui apenas íons Fe^{+2} em sua estrutura cúbica cristalina, sendo termodinamicamente instável e tendo comportamento paramagnético a temperatura ambiente. Óxido de ferro Fe_2O_3 contém apenas íons Fe^{+3} e pode ser encontrado em diferentes formas, com diferentes propriedades físicas e estruturas cristalinas, entre os polimorfos encontrados estão: $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (hematita), $\beta\text{-Fe}_2\text{O}_3$, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (maghemita) e $\epsilon\text{-Fe}_2\text{O}_3$ (ZBORIL et al., 2002; MACHALA et al., 2007; TUCEK et al., 2010).

A magnetita (Fe_3O_4), composto de interesse do presente trabalho, é um material ferromagnético e possui íons Fe^{+2} e Fe^{+3} sobre uma estrutura cristalina cúbica de espinélio invertido, com os íons O^{2-} coordenados a íons Fe^{+2} e Fe^{+3} em interstícios octaédricos (Figura 1). Os íons Fe^{+3} são divididos igualmente entre os interstícios tetraédricos e octaédricos, desta forma não existe momento magnético resultante na presença destes, enquanto que os íons Fe^{+2} residem apenas nos interstícios octaédricos, sendo responsáveis pela magnetização de saturação do composto e comportamento magnético do material (OLIVEIRA et al., 2013).

Figura 1 - Estrutura cristalina da magnetita.



Fonte: Oliveira et al. (2013).

2.1.2 Propriedades magnéticas

A classificação de um material magnético em relação a suas propriedades baseia-se na susceptibilidade magnética (χ), adimensional (com unidades representadas nas equações 1 e 2), que é a razão entre a magnetização induzida (M) e o campo magnético aplicado (H).

$$\chi = \frac{M}{H} \frac{[\text{emu}]}{[\text{Oe. cm}^3]} \quad (1)$$

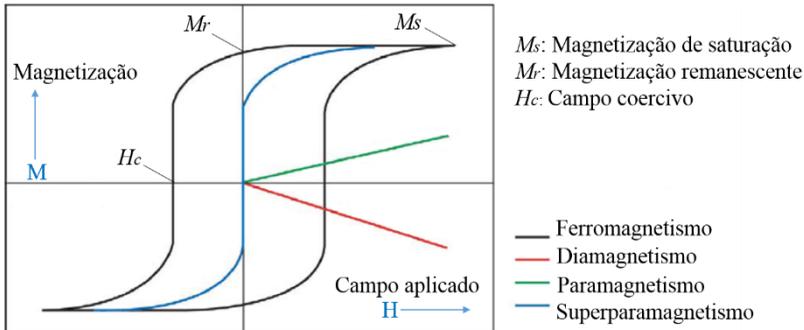
$$1 \frac{[\text{emu}]}{[\text{cm}^3]} = 1 \text{ Oe} \quad (2)$$

Curvas típicas de M versus H são chamadas de curvas de magnetização e variam de acordo com o tipo de substância. A Figura 2 representa uma curva M versus H . Com a aplicação de um campo externo o material segue a curva até atingir um patamar constante de magnetização, correspondente à magnetização de saturação, M_s , no qual M torna-se constante em altos valores de H . Quando H é reduzido a zero, após a saturação e o M não é reduzido a zero, ocorre a chamada histerese. Desta forma, diminuindo o campo a partir de M_s o M decresce seguindo o sentido de volta da curva até um valor residual de magnetização remanescente, M_r . H_c é o valor no qual a magnetização se anula para um determinado valor de campo magnético, é chamado de campo coercivo ou coercitividade (RIBEIRO, 2000; CULLITY e GRAHAM, 2009).

Curvas de materiais diamagnéticos ou paramagnéticos (Figura 2) possuem M linear e não retêm magnetização quando o campo é removido. Para materiais diamagnéticos, o momento magnético é antiparalelo a H , resultando em susceptibilidades negativas (-10^{-6} a -10^{-1}). Materiais paramagnéticos possuem momentos alinhados a H e susceptibilidades entre 10^{-6} a 10^{-1} . Em suma, materiais paramagnéticos e diamagnéticos não apresentam magnetização espontânea (CULLITY e GRAHAM, 2009).

Em materiais ferromagnéticos, os momentos magnéticos também se alinham a H (SUN et al., 2008) e a magnetização não é linear, desta forma, a χ varia com H e passa por um valor máximo M_s . Apresentam magnetização espontânea em pequenas regiões do material, denominadas domínios (CULLITY e GRAHAM, 2009).

Figura 2 - Curvas de histerese (magnetização em função do campo aplicado) características de NPs ferromagnéticas, diamagnéticas, paramagnéticas e superparamagnéticas e valores de remanescência, M_r , e campo coercivo, H_c .



Fonte: Adaptado de Arruebo et al. (2007).

χ e H são dependentes, e a relação entre os dois dá origem à forma sigmoideal característica da curva $M-H$, com M se aproximando do valor de saturação com o aumento de H . Em materiais ferromagnéticos é possível observar ciclos de histerese, dando origem a curvas abertas (Figura 2). A forma da curva $M-H$ é determinada em parte pelo tamanho de partícula, desta forma, partículas grandes na ordem de micrômetros apresentam ciclos de histerese amplos, enquanto que partículas na ordem de nanômetros, com único domínio, apresentam ciclos de histerese estreitos. Estas últimas podem ser consideradas superparamagnéticas, pois o momento magnético da partícula flutua em resposta a energia térmica e os momentos atômicos individuais mantêm-se ordenados uns em relação aos outros (PANKHURST et al., 2003).

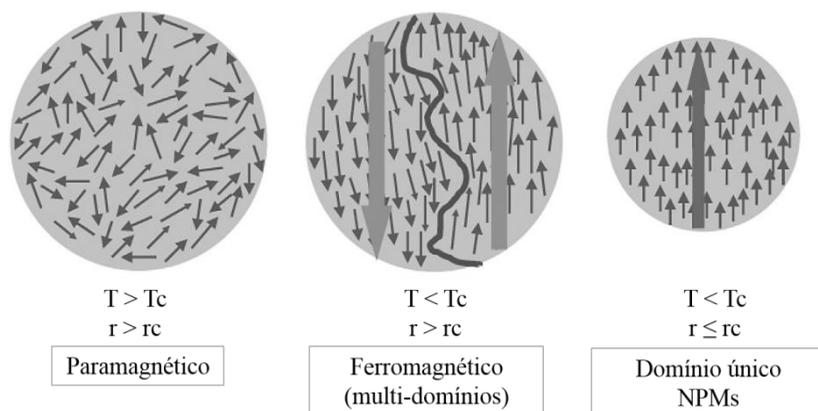
Frenkel e Doefman (1930) realizaram um estudo de dimensões para domínios magnéticos e concluíram que há um tamanho mínimo de domínio, sendo assim, cristais com dimensões inferiores a este tamanho mínimo não são divididos em domínios magnéticos, apresentando domínio único, e podem ser magnetizados.

Alguns materiais com tamanho de partícula na ordem de dezenas de nanômetros apresentam comportamento superparamagnético, tais como nanopartículas magnéticas de Fe_3O_4 , que apresentam propriedades ferromagnéticas em tamanhos micrométricos e superparamagnéticas em tamanhos nanométricos. A propriedade superparamagnética destas partículas é determinada pela ausência de magnetização remanescente (M_r) após o campo magnético externo ser

cessado, permitindo que as mesmas possuam estabilidade coloidal, evitando a agregação e permitindo a aplicação em diversas áreas (LU et al., 2007).

Qualquer material magnético, acima de sua temperatura de Curie (T_c), temperatura na qual o material se torna paramagnético, vai exibir seus spins magnéticos distribuídos aleatoriamente, levando a magnetização nula. Com o resfriamento das amostras para uma temperatura inferior a T_c , os domínios magnéticos voltam a aparecer, separados por paredes de domínios. Se as partículas apresentarem tamanho reduzido, uma dimensão crítica pode ser alcançada, abaixo da qual a formação de domínios pode se tornar desfavorável, e a amostra é constituída por um único domínio magnético, característica do superparamagnetismo (BEDANTA et al., 2015). A transição para um domínio magnético único é apresentada na Figura 3.

Figura 3 - Transição de multi-domínio para domínio único em nanopartículas magnéticas como uma função do raio.



Fonte: Adaptado de Bedanta et al. (2015).

O raio crítico (r_c) para a estrutura com único domínio depende da natureza do material e das diferentes interações entre as partículas, como interações dipolo-dipolo e trocas de interações.

2.1.3 Métodos de obtenção de NPMs

Devido ao potencial de uso de NPMs em diversas áreas, inúmeros métodos para a síntese das nanopartículas magnéticas têm sido descritos, via co-precipitação (KUO et al., 2012; ZHANG et al., 2014; KHOABI et al., 2015), decomposição térmica (ANDHARIYA et al., 2013) e microemulsão (MALIK et al., 2012).

O valor de pH e a presença de agente de revestimento, que serve como surfactante para a estabilização das NPMs, são pontos críticos no processo de síntese pois podem levar à incorporação de impurezas e rompimento da superfície cristalina do material, acarretando em baixos valores de magnetização de saturação (M_s). Em geral, valores de M_s de 30 a 50 emu/g são obtidos na síntese por estes métodos, valor inferior ao encontrado para a forma pura de Fe_3O_4 , por exemplo, (90 emu/g) (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003; GUPTA e GUPTA, 2005).

O método mais utilizado na preparação de nanopartículas magnéticas em grande escala é a co-precipitação aquosa, a partir da mistura de sais adequados. Entre suas vantagens destacam-se a simplicidade, via química mais eficiente e uma grande quantidade de nanopartículas magnéticas sintetizadas (TARTAJ et al., 2005). As partículas obtidas apresentam tamanhos inferiores a 50 nm, para isto, uma fonte alcalina, geralmente hidróxido de sódio (NaOH) ou hidróxido de amônio (NH_4OH) é adicionada à solução aquosa contendo sais ferrosos e férricos e surfactantes (TARTAJ et al., 2005; XU e SUN, 2013; STANICKI et al., 2015).

Os principais fatores que precisam ser controlados para que a síntese de NPMs seja satisfatória incluem: obtenção de nanopartículas monodispersas, controle do tamanho de partícula de forma reprodutível, obtenção de materiais com elevada cristalinidade, controle da forma e a estabilidade das NPMs a longos períodos (BEDANTA et al., 2015).

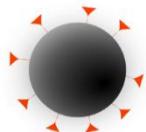
2.1.4 Modificação de superfície de NPMs

Nanopartículas magnéticas têm tendência à aglomeração como resultado de sua elevada energia interfacial. Desta forma, sua superfície precisa ser funcionalizada a fim de permitir sua estabilidade coloidal para futuras aplicações (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003). Os compostos utilizados na funcionalização da superfície, com núcleo de NPMs e superfície funcionalizada, vão ditar as características finais e as aplicações do material magnético.

A modificação permite maior resistência das NPMs em contato com o ar, estabilidade coloidal, estabilidade ao pH e a possibilidade de ligação com agentes externos pela inserção de grupos funcionais na superfície das nanopartículas (HOLA et al., 2015).

A Figura 4 apresenta diferentes combinações e modificações na superfície de NPMs para diferentes tipos de aplicações. Modificações de superfície com polímeros proporcionam uma barreira estérica e evitam a aglomeração de NPMs, mas a escolha do polímero a ser utilizado deve levar em conta a natureza de sua estrutura química (hidrofílico/hidrofóbico), a massa molecular e sua conformação, a fim de não alterar as características do material magnético (SUN et al., 2008). Diversos polímeros podem ser utilizados para atuar como estabilizadores na funcionalização da superfície das NPMs, entre eles polietilenoglicol, (PEG), polivinilpirrolidona (PVP), quitosana, entre outros (GUPTA e GUPTA, 2005).

Figura 4 - Tipos de arranjos entre NPMs e polímeros, moléculas e partículas inorgânicas.



NPMs enxertadas com compostos de baixa massa molecular



Polímero enxertado em NPMs



NPMs com polímeros bifuncionais (PEG)



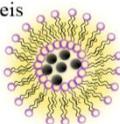
Multi estímulo
"materiais inteligentes"
Nano/Hidrogéis



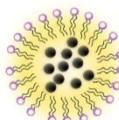
Aglomerados magnéticos



Pérolas de polímero poroso



Magnetolipossomas



Micelas



Casca inorgânica



Nanohíbridos inorgânicos:
Núcleo magnético



Nanohíbridos inorgânicos:
Casca magnética

Fonte: Adaptado de Hola et al. (2015).

O recobrimento com polímero *in situ*, durante a síntese das NPMs apresenta a vantagem de modificar a superfície, ao mesmo passo que as NPMs estão sendo sintetizadas, evitando a aglomeração, que pode ocorrer se o processo de modificação for realizado em etapa posterior a síntese do material magnético. Em contraponto, a presença de polímero durante a síntese de NPMs pode acarretar em modificações na estrutura cristalina do material e alterar suas propriedades magnéticas (SUN et al., 2008). Lee e colaboradores (1996) observaram a redução da cristalinidade de Fe_3O_4 com o aumento da concentração de poli(vinil álcool), (PVA), em solução aquosa na síntese por co-precipitação.

Ainda em métodos para produção de NPMs com revestimentos poliméricos, a síntese dos materiais de forma separada pode ser uma alternativa. Após a obtenção das NPMs e do polímero separadamente, os materiais são colocados em contato para adsorção química e/ou física do polímero na superfície das NPMs, podendo o polímero ser obtido por diferentes técnicas de polimerização.

Também é possível realizar a encapsulação de NPMs em polímeros para formar estruturas casca-núcleo, por meio de polimerizações via emulsão, precipitação e minimiemulsão (que será discutida no item 2.2.4). Nestes sistemas, as NPMs geralmente estão funcionalizadas com um surfactante que permite a dispersão destas nos monômeros de interesse (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003). Em sínteses de NPMs pela precipitação de Fe^{+3} e Fe^{+2} em solução aquosa com uma base, é muito comum o recobrimento das NPMs obtidas com ácido oleico adsorvido na superfície (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003; LU e FORCADA, 2006; FEUSER et al., 2015), este revestimento permite a dispersão das NPMs em monômeros hidrofóbicos.

2.1.5 Aplicações de NPMs

Em baixas concentrações, NPMs não apresentam toxicidade, além de apresentarem características de biodegradabilidade e biocompatibilidade. Aliados a estes fatores, seu tamanho reduzido e comportamento superparamagnético as tornam promissoras para uso nas áreas médica e biotecnológica (STANICKI et al., 2015).

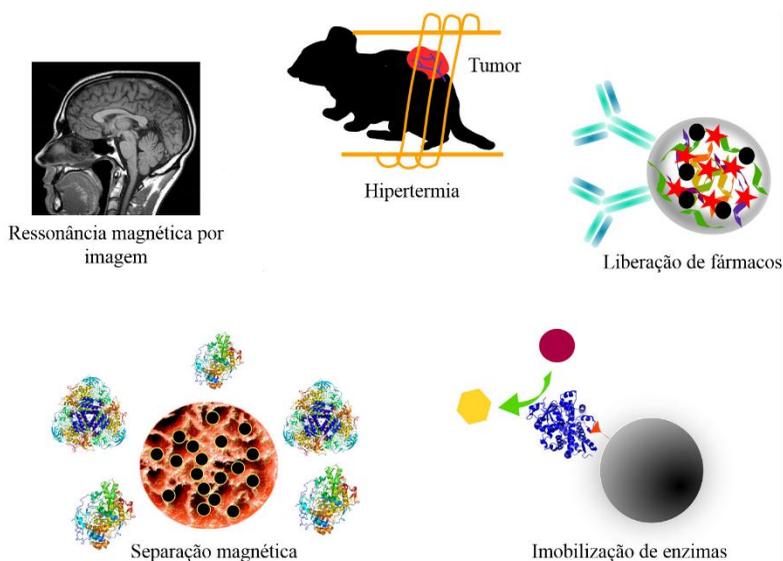
Em condições de superparamagnetismo, NPMs de Fe_3O_4 apresentam alto efeito de contraste em ressonância magnética sendo controladas por um campo magnético externo e apresentando alta resposta magnética quando uma pequena força de campo é aplicada.

A vantagem de usar NPMs de óxidos de ferro como agentes de contraste está relacionada à sua biocompatibilidade. O tamanho de

partícula, carga e agente utilizado para o recobrimento determinam o seu tempo de circulação e sua biodistribuição no organismo (SHUBAYEV et al., 2009), geralmente partículas acima de 200 nm acabam localizadas no baço para posteriormente serem fagocitadas, enquanto que partículas na faixa de 10 nm são rapidamente removidas do organismo pela depuração renal (JAIN et al., 2008).

A aplicação das NPMs (Figura 5) em ressonância magnética por imagem (MRI) é um dos usos mais promissores das NPMs na biomedicina e pode levar a diagnósticos precoces de tumores em diferentes órgãos alvo. A superfície das nanopartículas pode ser funcionalizada com marcadores específicos de câncer para sua localização no organismo (TANAKA et al., 2004; COROT et al., 2006).

Figura 5 - Aplicações biomédicas e biotecnológicas de NPMs.



Fonte: Adaptado de Hola et al. (2015).

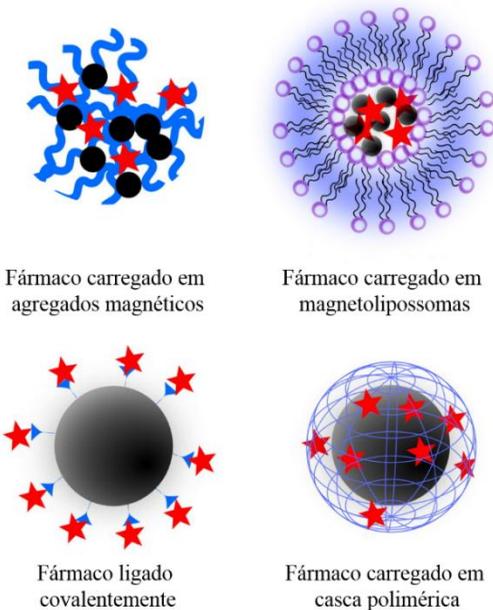
Tratamentos de tumores pelo aquecimento das células doentes por hipertermia é uma alternativa viável, as NPMs absorvem as correntes energéticas e as transformam em calor, alguns inconvenientes como superaquecimento devem ser evitados a fim de não ocasionar

morte celular. Assim, a combinação de liberação de fármacos aliada a hipertermia pode ser uma solução para o tratamento de tumores (FEUSER et al., 2015; HOLA et al., 2015).

Em sistemas de liberação de fármacos, as NPMs são utilizadas para serem concentradas em um local específico do corpo, (ARRUEBO et al., 2007; SHUBAYEV et al., 2009), visando não danificar os tecidos saudáveis. Desta forma, além de atuarem como carreadoras de fármacos podem ser direcionadas ao órgão-alvo doente pela aplicação de um campo magnético externo (CHERTOK et al., 2008).

A liberação controlada não dependerá apenas da liberação por estímulos externos, mas pode ser realizada em valores de baixo pH, característico em tecidos de câncer. Diversos tipos de revestimento podem ser utilizados para o sistema de transporte de fármacos a fim de melhorar a liberação específica do material no alvo (Figura 6).

Figura 6 - Sistemas de entrega de fármacos com NPMs.



Fonte: Adaptado de Hola et al. (2015).

Com a encapsulação do material magnético em uma matriz polimérica, o sistema pode ser aplicado na liberação controlada em tratamento de doenças específicas, além de permitir a redução da dosagem do fármaco, uma vez que a liberação no organismo vai ocorrer de forma controlada, dependendo das características de degradação da matriz polimérica.

Além de todas as aplicações descritas acima, NPMs podem ser utilizadas na separação de substâncias de interesse, como íons, poluentes, células, proteínas, anticorpos e várias substâncias bioativas. Além disso, podem ser utilizadas na imobilização de enzimas para posterior atuação em biocatálise, podendo mediar reações de síntese de aromas e biodiesel (XIE e MA, 2009; TRAN et al., 2012; KHOOBI et al., 2015). Inúmeros métodos podem ser aplicados no processo de imobilização, sendo que a estrutura da enzima a ser imobilizada precisa ser preservada. As enzimas, contendo grupamentos como amida, carboxila e tiol em sua superfície, podem ser fixadas em NPMs pela ligação entre estes grupos.

2.2 ENCAPSULAÇÃO DE NPMs EM NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS

A encapsulação de NPMs em partículas poliméricas aumenta as possibilidades de aplicação destas em função de uma série de vantagens, entre elas a proteção advinda da casca polimérica, a estabilização contra a agregação, mantendo o material com propriedades superparamagnéticas e o polímero pode ser carregado com um fármaco para sistemas de liberação controlada (LANDFESTER e WEISS, 2010). Como as NPMs de Fe_3O_4 obtidas via co-precipitação em solução aquosa são hidrofílicas, necessitam ser hidrofobizadas antes da encapsulação em polímero hidrofóbico.

Entre as aplicações de NPMs encapsuladas em polímeros as mais frequentes são: aplicações biomédicas, incluindo terapia celular, aplicações em diagnósticos (MEDEIROS et al., 2011; AKBARZADEH et al., 2012), agentes de contraste em MRI (ILLÉS et al., 2014), hipertermia (SHETE et al., 2015), liberação de fármacos (TAN et al., 2005) e em imobilização de enzimas (REN et al., 2011; SOHRABI et al., 2014; WANG et al., 2014; ATACAN e ÖZACAR, 2015) com aplicação em biocatálise (MAHMOOD et al., 2013), incluindo a produção de biodiesel (XIE e MA, 2009; TRAN et al., 2012) e síntese enzimática de aromas (KHOOBI et al., 2015).

2.2.1 Encapsulação *in situ* de NPMs em polímeros

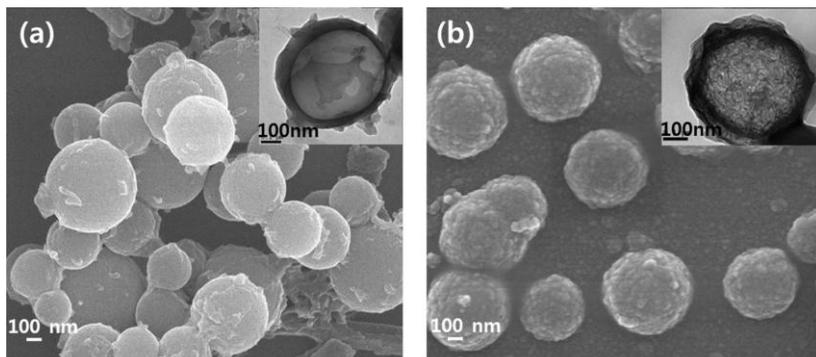
Diversas técnicas podem ser aplicadas para a encapsulação *in situ* de NPMs durante a síntese de polímeros, incluindo polimerização em emulsão (YANASE et al., 1993), polimerização em emulsão inversa (CHEN et al., 2012), polimerização em miniemulsão inversa (XU et al., 2004; ROMIO et al., 2013) e polimerização em miniemulsão direta (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003; LU e FORCADA, 2006; STAUDT et al., 2013). Os revestimentos poliméricos (casca polimérica) são compostos em sua maioria por polímeros obtidos por polimerização via radicais livres, como poliestireno e copolímeros, poli(metacrilato de metila), poliacrilamida entre outros.

No entanto, existem diversos outros polímeros com propriedades interessantes que são obtidos por polimerização em condensação, como poliuretano (PU) e poli(ureia-uretano), (PUU), que podem ser usados para encapsular NPMs.

Um dos poucos trabalhos que relataram a encapsulação de NPMs por policondensação foi realizado por Park e colaboradores (2014), descrevendo a síntese de nanocápsulas de materiais com mudança de fase, *phase change material*, (PCM) contendo NPMs de Fe_3O_4 pela seguinte morfologia: núcleo de parafina e casca de poliureia, formada por polimerização interfacial. Os resultados mostraram que as NPMs foram localizadas na casca de poliureia após a polimerização, devido ao efeito Pickering, assim as NPMs atuaram estabilizando as gotas da emulsão.

Os autores observaram que as nanocápsulas de PCM-NPMs apresentaram resposta a campo magnético externo, embora as propriedades de magnetização não tenham sido medidas. A Figura 7 mostra a morfologia das nanocápsulas de PCM-NPMs obtidas por Park e colaboradores com e sem material magnético incorporado. É possível observar a morfologia esférica das nanocápsulas com estrutura núcleo-casca composta por parafina-poliureia e as NPMs localizadas na superfície.

Figura 7 - Micrografias de MEV e MET (canto superior direito) das nanocápsulas de PCM (a) sem material magnético e (b) com material magnético.



Fonte: Park et al. (2014).

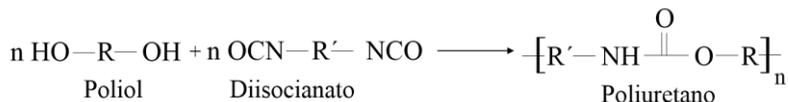
2.2.2 Nanopartículas de poli(ureia-uretano)

Nanopartículas de PU e PUU podem ser obtidas a partir de uma infinidade de monômeros diferentes, o que as tornam ainda mais atraentes para inúmeras aplicações comerciais, como revestimentos (CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007), espumas (ZHANG et al., 2014), adesivos, selantes, couro sintético, membranas, elastômeros, imobilização de enzimas (CIPOLATTI et al., 2014), nanotransportadores para agentes anticorrosivos (GITE et al., 2015) e aplicações biomédicas (CHATTOPADHYAY e WEBSTER, 2009) em sistemas de liberação de fármacos (MORRAL-RUÍZ et al., 2014; GENTILE et al., 2015). As características finais dos polímeros obtidos estão diretamente relacionadas com a escolha dos monômeros.

O polímero de poli(ureia-uretano) apresenta repetidas ligações uretano em sua cadeia. Além de repetidos grupos uretanos, outros grupos como ureia, éster, éter e aromáticos podem estar presentes em sua estrutura (CHATTOPADHYAY e RAJU, 2007).

As partículas de poliuretano são formadas basicamente pela reação em etapas entre um grupo isocianato ($-N=C=O$) e um grupo álcool ($-OH$), bi ou multifuncionais, e a formação básica é representada na Figura 8.

Figura 8 - Reação de formação de poliuretano pela reação entre polioli e diisocianato.



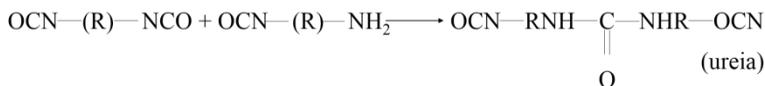
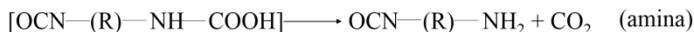
Fonte: Autor (2015).

A reação com isocianato ocorre pela adição à dupla ligação C=N. Desta forma, um centro nucleofílico contendo um átomo de hidrogênio ativo ataca o carbono eletrofílico e o átomo de hidrogênio ativo é adicionado ao nitrogênio. Grupos aceptores de elétrons ligados ao grupamento NCO aumentam sua reatividade e os doadores a reduzem, por isso isocianatos aromáticos são mais reativos que alifáticos (DE LIMA, 2007).

Desta forma, a principal reação envolvida leva à formação de poliuretano, por meio do isocianato e da hidroxila, porém reações secundárias podem ocorrer paralelamente. Entre elas, a reação entre diisocianato e água, levando à formação da ligação ureia e reduzindo a massa molar do polímero formado. A reação entre o diisocianato e água gera ácido carbâmico, este se decompõe gerando dióxido de carbono, CO₂, e amina correspondente, esta amina volta a reagir com outra molécula de diisocianato formando ureia. Na etapa de decomposição do ácido carbâmico, CO₂ é liberado, e este é fator crucial na fabricação de espumas, uma vez que é utilizado como agente de expansão (TIARKS et al., 2001; ODIAN, 2004).

As reações envolvidas na formação de ligações ureia são descritas na Figura 9.

Figura 9 - Reação de formação de ligações ureia.



Fonte: Autor (2015).

A presença de segmentos flexíveis na cadeia polimérica refere-se aos segmentos de polioli e conferem características elastoméricas ao polímero, resultando em maior flexibilidade. Já os segmentos rígidos, referentes ao diisocianato conferem propriedades como dureza e resistência (VALÉRIO et al., 2014).

2.2.3 Síntese de NPs de PUU

Partículas de PUU podem ser obtidas por diferentes métodos de polimerização, como polimerização interfacial em miniemulsão (SALAÜN et al., 2011), gerando partículas em faixas micrométricas. Para a síntese de partículas de PUU na faixa submicrométrica processos de emulsão-difusão (SOUGUIR et al., 2013), polimerização interfacial em miniemulsão (VALÉRIO et al., 2015), polimerização interfacial em miniemulsão inversa (CRESPY et al., 2007; ROSENBAUER et al., 2009), e polimerização em miniemulsão (TIARKS et al., 2001; GAUDIN e SINTES-ZYDOWICZ, 2011; CIPOLATTI et al., 2014; VALÉRIO et al., 2014) podem ser aplicados.

Reações de formação de PU e PUU podem ser realizadas via polimerização em etapas, utilizando poliois solúveis em água e diisocianatos hidrofóbicos (TORINI et al., 2005; JOHNSEN e SCHMID, 2007). Conforme mencionado no item anterior e mostrado na Figura 9, a reação do diisocianato com a água origina grupamentos amino, que podem reagir com outro grupamento diisocianato, levando à formação de ureia como subproduto. Em função disto, geralmente são utilizados diisocianatos com baixa reatividade em água, como o diisocianato de isoforona, (IPDI), uma vez que reagindo lentamente com a água da fase contínua, a formação de ureia é reduzida (LANDFESTER e WEISS, 2010).

Apesar de toda flexibilidade e aplicações de PU e PUU, a encapsulação de magnetita em PUU não foi relatada anteriormente na literatura.

2.2.4 Reações de polimerização em miniemulsão

Reações de polimerização em miniemulsão possuem diversas vantagens, uma vez que são classificadas como uma técnica versátil, onde o *locus* de polimerização encontra-se dentro das gotas de monômero submicrométricas, que atuam como “nanoreatores” (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003).

A preparação da miniemulsão consiste na mistura de dois líquidos imiscíveis pela homogeneização em equipamentos com alta força de cisalhamento, tipicamente ultrasonicadores em escala laboratorial e homogeneizadores de alta pressão em escala industrial.

Os ultrasonicadores produzem ondas de ultrassom que causam a oscilação das moléculas próximas à região de propagação das ondas. O tamanho das gotas diminui com o tempo de sonicação até um determinado momento, a partir do qual seus valores tendem a permanecer constantes, dependendo da formulação, da energia aplicada e da quantidade do meio reacional (ASUA, 2002).

Tipicamente a formulação de uma miniemulsão é composta por água, monômero (ou mistura de monômeros), coestabilizador, surfactante e iniciador (quando a polimerização ocorre via radicais livres). Geralmente o surfactante é dissolvido na fase contínua (aquosa) e o coestabilizador no monômero (fase dispersa) (ASUA, 2002).

Ao contrário das microemulsões, as miniemulsões não são estáveis termodinamicamente, sendo estabilizadas contra colisões entre as gotas e a degradação difusional com o uso, respectivamente, de surfactantes e coestabilizadores (geralmente compostos insolúveis em água com baixa massa molar) (MUÑOZ-ESPÍ et al., 2012).

Diversas vantagens podem ser relacionadas ao método de polimerização em miniemulsão, como possibilidade de utilização de monômeros solúveis e insolúveis em água, látices estáveis e com alto teor de sólidos, possibilidade de obtenção de materiais híbridos orgânicos/inorgânicos e a possibilidade de aplicação em reações em cadeia e em etapas (SCHORK et al., 2005; OUZINEB et al., 2006).

Reações de polimerização em miniemulsão podem ocorrer na interface das nanogotas formadas após o processo de miniemulsificação, uma vez que o monômero hidrofílico pode estar presente na fase aquosa e o monômero hidrofóbico na fase orgânica.

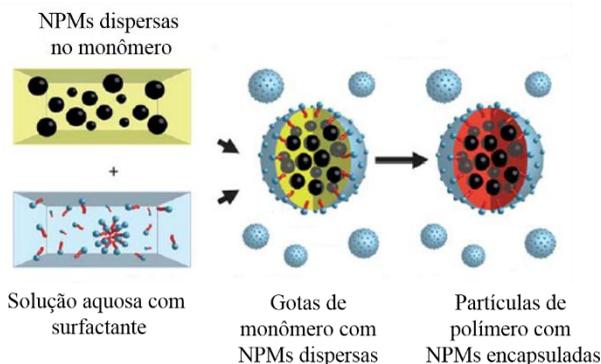
Este método ocorre em duas etapas, na primeira, é formada uma emulsão grosseira com gotas compostas pelo monômero hidrofóbico, no caso de poli(ureia-uretano) o diisocianato, e na segunda etapa, com a adição da fase aquosa (contendo o monômero hidrofílico, polioliol) à fase orgânica, iniciando a reação de polimerização na interface da gota hidrofóbica, com a reação entre os grupos funcionais diisocianato-polioliol (BOUCHEMAL et al., 2004).

2.2.5 Encapsulação de NPMs em NPs poliméricas via polimerização em miniemulsão

A encapsulação de NPMs em emulsão já foi reportada anteriormente por diversos autores, porém nesta técnica o controle da morfologia e do tamanho de partícula é dificultado, uma vez que o *locus* de polimerização se encontra na superfície das NPMs. Além da restrição da técnica, uma vez que esta só pode ser utilizada para polimerizações radiculares.

Na encapsulação em miniemulsão, as NPMs podem ser dispersas diretamente nas gotas de monômero, que se transformam em partículas poliméricas (contendo material encapsulado) após a polimerização (Figura 10). Desta forma, as NPMs encontram-se no *locus* de polimerização e permanecem no mesmo até a formação do composto polímero-material inorgânico final (ASUA, 2002).

Figura 10 - Síntese de NPMs encapsuladas em polímero via polimerização em miniemulsão.



Fonte: Adaptado de Lowe (2010).

Condições como uma boa dispersão das NPMs no monômero, boa estabilidade da solução aquosa contendo gotas de monômero-NPMs, eficiente sonicação, uso de coestabilizador e tipos de iniciadores (em reações via radicais livres) devem ser investigadas a fim de obter altas eficiências de encapsulação (ASUA, 2002).

Devido à hidrofiliicidade de NPMs de Fe_3O_4 , sua superfície precisa ser hidrofobizada para a encapsulação em polímeros hidrofóbicos. Na maioria dos casos, ácido oleico (AO) é utilizado na

hidrofobização, uma vez que há a forte ligação química entre o ácido carboxílico, proveniente do ácido oleico, e as nanopartículas de óxido de ferro (ZHANG et al., 2006).

Feuser e colaboradores (2015) hidrofobizaram NPMs de Fe_3O_4 com AO após a síntese por co-precipitação e conduziram a encapsulação das NPMs-AO em nanopartículas de poli(metacrilato de metila), PMMA, via polimerização em miniemulsão, obtendo 20% de NPMs de Fe_3O_4 encapsuladas em PMMA após a polimerização. Análise de difração de raio-X, DRX, das NPMs-AO e NPMs-AO encapsuladas em PMMA apresentaram seis picos característicos em 2θ : 220, 311, 400, 422, 511 e 440. Estes resultados indicaram que a encapsulação do material magnético na matriz polimérica não afetou na cristalinidade da magnetita.

Landfester e Ramirez (2003) encapsularam NPMs de Fe_3O_4 em partículas de poliestireno por uma rota incluindo dois processos de miniemulsão. Na primeira etapa, NPMs revestidas com AO em octano foram preparadas. Em seguida, a dispersão de magnetita em octano foi miniemulsificada em água usando dodecil sulfato de sódio (SDS), como surfactante. Após a evaporação do octano, agregados de Fe_3O_4 recobertos com AO/SDS foram misturados a uma miniemulsão contendo monômero. Um processo de miniemulsificação foi realizado a fim de obter a completa encapsulação e análises de termogravimetria e magnetometria indicaram que 40% do material magnético foi encapsulado nas partículas de polímero e que 60% da magnetização (em relação à magnetita pura) foi mantida.

Assim como nos casos descritos acima, a maioria das reações envolvendo a encapsulação de materiais magnéticos são realizadas por polimerização radicalar, sendo a encapsulação via polimerização em etapas uma área a ser explorada.

2.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NPs POLIMÉRICAS MAGNÉTICAS

Devido a suas elevadas propriedades catalíticas, especificidade e condições reacionais brandas de operação, enzimas são catalisadores desejáveis em diversos tipos de processos (KRAJEWSKA, 2009). A imobilização de enzimas em suporte magnético é uma alternativa viável frente à praticidade de separação do meio reacional e reuso, possibilidade de utilização do biocatalisador em processo contínuo, maior estabilidade a pH e temperatura e a redução de custos no processo industrial (FORESTI et al., 2010). Desta forma, os itens inclusos na

seção 2.3 visam abordar a importância da imobilização de enzimas e sua relação com suportes magnéticos.

2.3.1 Enzimas

A busca por processos verdes e ambientalmente favoráveis têm dado destaque a biocatálise sustentável, em lugar a reações mediadas com catalisadores químicos tóxicos. A utilização de enzimas em processos biotecnológicos permite a utilização de condições de reação suaves no que diz respeito à temperatura, pressão e pH, além de serem completamente biodegradadas. Outro fator determinante é a alta quimio, regio- e enantio-especificidade oferecida por estes materiais (QIAO et al., 2015).

As enzimas possuem uma região ativa em sua estrutura, que permite a catálise enzimática. O substrato liga-se ao sítio ativo da enzima e a especificidade da mesma depende da natureza das ligações envolvidas e do arranjo definido de átomos no sítio. Sua seletividade as tornam muito atrativas para o uso industrial, uma vez que não há formação de subprodutos indesejáveis ao fim do processo, o que representa em economia e maior produtividade para a indústria, eliminando a necessidade de um processo de separação e purificação do produto final, além de reduzir os efluentes gerados.

Possuem aplicação a substratos não naturais e são estáveis em solventes orgânicos, possibilitando a realização de reações com substratos insolúveis em água (KRAJEWSKA, 2004; REBELO, 2009). Devido sua quimiosseletividade, atuam em único grupo funcional, preservando outras funcionalizações da molécula. Sua estrutura tridimensional consegue distinguir grupos funcionais iguais em diferentes regiões da mesma molécula-substrato, característica oriunda da sua regioseletividade. A enantioseletividade as classifica como um catalisador quiral, produzindo compostos opticamente ativos (KRAJEWSKA, 2004).

Dentre a gama de aplicações das enzimas, destacam-se as áreas química, bioquímica, biomédica, farmacêutica e áreas industriais. Aplicações analíticas também têm sido beneficiadas das reações enzimáticas em meio orgânico, a fim de resolver problemas em diversas áreas, como clínica, por exemplo (DIJKSTRA et al., 2007; IDRIS e BUKHARI, 2012).

Apesar de todas as suas vantagens, as enzimas também possuem alguns inconvenientes, uma vez que exigem parâmetros específicos de uso. Operar em condições brandas de reação pode se

tornar um empecilho em determinados processos industriais. A utilização de solventes orgânicos pode causar alterações conformacionais na estrutura da enzima, podendo acarretar em perda de atividade. As enzimas podem também sofrer vários tipos de inibição, tanto pelo substrato, quanto pelo produto, o que pode ser controlado operacionalmente.

Estudos estão sendo realizados a fim de amenizar estas desvantagens provenientes dos catalisadores para sua utilização em reações biocatalisadas. Dentre as modificações, insere-se o uso de solventes orgânicos, adição de inibidores e técnicas de imobilização (DIJKSTRA et al., 2007; TRAN et al., 2012).

Dentre os diversos grupos de enzimas destacam-se as lipases, devido inúmeras reações catalisadas em sistemas orgânicos com baixo teor de água, alta estabilidade nestes ambientes e possibilidade de uso em condições brandas.

2.3.2 Lipases

Lipases são enzimas que catalisam a quebra de gorduras e óleos liberando ácidos graxos, diacilgliceróis, monoacilgliceróis e glicerol. São eficientes em reações de esterificação, transesterificação e aminólise em solventes orgânicos, sendo as enzimas mais utilizadas tanto em processos industriais, quanto em estudos acadêmicos (FORESTI et al., 2010; IDRIS e BUKHARI, 2012).

Quando obtidas via microrganismos, inserem-se em um grupo valioso de enzimas para aplicações em biotecnologia, devido sua versatilidade (uma vez que atuam em meios aquosos e não aquosos), especificidade do substrato e facilidade de produção em grandes quantidades (KOBAYASHI et al., 2001).

Podem ser produzidas por fermentação usando várias espécies de microrganismos, tais como os fungos *Aspergillus mucor*, *Rhizopus penicillium*, *Geotrichum* sp., por leveduras de *Tulopis* sp. e *Candida* sp. e bactérias como *Pseudomonas* sp., *Achromobacter* sp. e *Staphylococcus* sp. Também podem ser encontradas em tecidos de animais e plantas, apesar da abundância via fonte natural, lipases obtidas de microrganismos são a escolha das indústrias devido ao alto custo de seu isolamento em animais e plantas (DALLA-VECCHIA et al., 2004).

Dentre as lipases, as produzidas por *Candida* sp. destacam-se das demais, já que são enzimas estabelecidas para fins de biocatálise, especialmente lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB) (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005).

2.3.3 Lipase de *Candida antarctica* do tipo B (CALB)

A lipase CALB tem sido alvo de estudo para aplicações em diferentes tipos de indústrias, entre elas alimentícia, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e oleoquímica. Estas possíveis aplicações devem-se às características particulares que incluem alta especificidade, alta atividade catalítica para reações brandas, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica e a amplas faixas de pH e alta estereo especificidade (DENG et al., 2011; IDRIS e BUKHARI, 2012).

A CALB é composta por 317 resíduos de aminoácidos arranjados sequencialmente e possui peso molecular de 33 kDa (kilodalton) e pI (ponto isoelétrico) de 6,0. Os aminoácidos (AA) valina, leucina, isoleucina, glicina e alanina contribuem em 40,1% na sequência da proteína, serina e treonina contribuem com 18,3% dos AA totais. Os demais AA correspondem a 15,8% de ácido aspártico, ácido glutâmico, asparagina e glutamina, 9,46% de prolina, 7,6% de triptofano, tirosina e fenilalanina, 5,6% de arginina, lisina e histidina, e os 3,15% associados a cisteína e metionina (UPPENBERG et al., 1994).

O sítio ativo, onde ocorrerá a ligação com o substrato é dividido em duas cavidades, em uma ocorrem as ligações acila e na outra porção do sítio ocorrem as ligações com álcoois. Diferentemente das outras lipases, a CALB não apresenta impedimento na entrada do sítio ativo, não prejudicando desta forma entrada e saída de subprodutos (UPPENBERG et al., 1994).

Uma das lipases mais reportadas na literatura para aplicação em síntese de ésteres é a lipase comercial Novozym 435, nome dado à preparação de CALB imobilizada. O suporte da Novozym 435 consiste basicamente em resina (Lewatit OC 1600) macroporosa, com carga de 8,5 a 20% (m/m) de enzima no suporte. Apresenta tamanho de partícula entre 0,3-0,9 mm, densidade de aproximadamente 430 kg/m³ e conteúdo de água entre 1-2%. É uma lipase termoestável com uma atividade ótima na faixa de temperatura entre 40-80 °C (IDRIS e BUKHARI, 2012).

O uso de lipases como catalisadores oferece diversas vantagens ao sistema, como maior eficiência reacional, redução de misturas racêmicas e menor consumo de energia. Porém, a lipase em sua forma livre está sujeita à inativação, podendo sofrer desnaturação, perdendo desta forma sua estrutura conformacional. Além da dificuldade de recuperação e reuso. Para tornar seu uso mais atraente, a imobilização é um método que supre as dificuldades de uso das enzimas em sua forma livre e as tornam mais viáveis e rentáveis para o uso comercial.

2.3.4 Imobilização de lipases

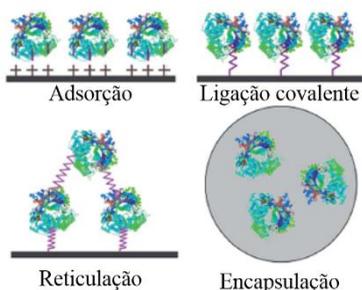
A imobilização de enzimas visa obter um catalisador com atividade e estabilidade que não sejam afetadas durante o processo de imobilização em comparação a sua forma livre. Em casos ideais, a enzima imobilizada deverá apresentar uma atividade catalítica superior sem que ocorram alterações estruturais e mudanças conformacionais no sítio ativo (GANDHI, 1997).

A fim de desenvolver métodos para a melhoria das propriedades catalíticas como atividade, estabilidade (pH ou faixas de temperatura) e sua capacidade de reciclagem, as modificações podem ser realizadas por métodos químicos e físicos (ROMASKEVIC et al., 2006).

Os materiais escolhidos como suporte que irão ditar as características finais para cada aplicação específica, sendo que variando o material, diferentes características de resistência mecânica, estabilidade química e física, caráter hidrofílico/hidrofóbico, carga de enzima e custos operacionais serão obtidos.

Os métodos compreendem: imobilização não covalente, como adsorção não covalente e deposição, ligação covalente única, várias ligações covalentes, aprisionamento em gel polimérico, membrana ou cápsula, reticulação da enzima e cristais de enzima. Os principais métodos de imobilização de enzimas serão apresentados nos itens a seguir e são mostrados na Figura 11.

Figura 11 - Métodos de imobilização de enzima em suporte.



Fonte: Adaptado de Iqbal et al. (2013).

2.3.4.1 Imobilização de enzimas por adsorção

Um dos métodos mais simples e utilizados propostos para a imobilização de enzimas é pelo processo de adsorção. O mecanismo é baseado em ligações fracas como ligações de Van der Waals, ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas e/ou hidrofóbicas (IQBAL et al., 2013).

Apesar do método não apresentar redução na atividade da enzima, alguns inconvenientes podem ser observados, como a fraca ligação da enzima/suporte e a dessorção da enzima frente a mudanças na temperatura, pH e força iônica, que pode acarretar em contaminação do substrato residual e/ou produto formado. (KUMAKURA e KAETSU, 2003; SASSOLAS et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

No procedimento de imobilização, a enzima dissolvida em solução é colocada em contato com o suporte sólido (orgânico ou inorgânico) por um tempo fixo. Após a imobilização, a enzima se encontra adsorvida fisicamente na superfície do suporte e a enzima não adsorvida é retirada através da lavagem com solução tampão. Como a interação entre o suporte e a enzima são reversíveis, há a possibilidade de alta retenção de atividade do catalisador.

Conforme é aumentada a concentração do catalisador, aumenta a sua quantidade adsorvida na superfície, até atingir um patamar de saturação. O pH em que a adsorção é realizada é fator crucial na eficiência da imobilização e geralmente é conduzido próximo ao ponto isoelétrico da enzima. A adição de solventes miscíveis em água favorece a adsorção, reduzindo a solubilidade da enzima na fase aquosa (VILLENEUVE et al., 2000).

Na imobilização de CALB por adsorção, o valor de pH é critério essencial, uma vez que o pH ótimo encontra-se na faixa de 6 a 8 na conformação da enzima livre (MILETIĆ et al., 2010; RODRIGUES et al., 2013). Diversos trabalhos reportados na literatura, utilizando a técnica de imobilização por adsorção demonstraram o aumento da atividade enzimática, estabilidade operacional, térmica e conformacional da enzima após o processo de imobilização (FORESTI et al., 2010; MILETIĆ et al., 2010).

2.3.4.2 Imobilização de enzimas por ligação covalente

No método de imobilização via ligação covalente, ocorre a ligação química entre os grupos funcionais da enzima e do suporte. Geralmente os grupos funcionais das enzimas envolvidos nas ligações

covalentes são resíduos de aminoácidos de lisina ou arginina, grupos carboxílicos provenientes do ácido aspártico e ácido glutâmico, grupos hidroxila da serina e treonina e grupo sulfidrílo da cisteína (IDRIS e BUKHARI, 2012).

No processo de imobilização, a baixa atividade ou inativação da enzima pode ser devido à menor mobilidade de cadeia, diminuindo a liberdade de movimento da enzima e a maior rigidez das moléculas de proteína (IDRIS e BUKHARI, 2012; IQBAL et al., 2013).

A vantagem da imobilização encontra-se na dificuldade da liberação da lipase a partir do suporte quando comparada com outros métodos descritos na literatura (ELNASHAR, 2010). Apesar da maior retenção enzima-suporte, as ligações formadas podem perturbar a estrutura da enzima em sua forma livre, fornecendo ao mesmo tempo uma forte retenção desta no material de suporte (DURÁN et al., 2002).

Muitos suportes orgânicos ou minerais podem ser utilizados, porém muitas vezes antes da realização da ligação covalente, este suporte precisa ser modificado. Esta modificação consiste na ativação pela incorporação de um grupo químico que possa reagir com os grupos laterais da proteína (VILLENEUVE et al., 2000).

Kuo e colaboradores (2012) imobilizaram a lipase de *Candida rugosa* covalentemente em NPMs de Fe_3O_4 revestidas com quitosana utilizando 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, (EDC), e N-hidroxissuccinimida, (NHS), como agentes de acoplamento. A lipase imobilizada mostrou melhor estabilidade térmica, ao pH e ao armazenamento quando comparada com a enzima livre.

2.3.4.3 Reticulação

A imobilização de enzimas por reticulação é um método simples obtido por reação intermolecular, uma vez que a ligação ocorre entre a enzima e o agente de reticulação, um dos mais utilizados é o glutaraldeído.

Pode ocorrer pela ligação da enzima com outra proteína, produzindo aglomerados de biomoléculas. Neste caso, a imobilização da enzima via ligação covalente cruzada dispensa o uso de um material suporte, a formação de ligações covalentes ocorre entre as moléculas da proteína, pela utilização de substâncias multifuncionais (FERNANDES et al., 2010). Em casos de utilização de suporte, este deve apresentar grupos funcionais, desta forma incorporando a enzima em polímeros, por exemplo.

Devido à sua simplicidade, é um método muito atrativo, porém a toxicidade dos reagentes e a alta perda de atividade enzimática são fatores limitantes para a aplicação das enzimas imobilizadas por essa via. Métodos como a encapsulação e a adsorção são mais leves, uma vez que não envolvem o uso de reagentes tóxicos e garantem maior proteção da enzima (IQBAL et al., 2013).

2.3.4.4 Encapsulação

Outra estratégia de imobilização de uma lipase é a sua inclusão em partículas poliméricas ou em microcápsulas. Durante o preparo da reação, a lipase é inserida na fase monomérica e após a polimerização fica retida no interior do material polimérico, sendo que altas cargas de enzima podem ser inseridas no suporte sem que haja interação entre a enzima e o polímero.

Além de ser considerado um método barato, diminui a dessorção da enzima do suporte, uma vez que esta está protegida pelo invólucro polimérico, e a ausência de ligações covalentes entre os resíduos de aminoácidos da enzima e o polímero aumenta a estabilidade do catalisador (IQBAL et al., 2013).

As matrizes mais utilizadas para a imobilização compreendem polímeros sol-gel, géis de poliacrilamida, materiais de natureza inorgânica, pré-polímeros de uretano e resinas fotorreticuláveis, neste último caso, a imobilização ocorre com a inserção de um fotossensibilizador no pré-polímero e a iniciação da reação é feita por radiação UV (HERTZBERG et al., 1992).

A desvantagem da técnica está relacionada com o acesso limitado de substratos macromoleculares ao sítio ativo da enzima, pois estes não conseguem ultrapassar a membrana polimérica formada (IQBAL et al., 2013).

2.3.4.5 Aprisionamento

As enzimas podem ser imobilizadas em matrizes tridimensionais, podendo ser incorporadas em géis ou polímeros. Não há existência de ligação química entre o monômero e a enzima e diversos tipos de enzima podem ser imobilizadas com o mesmo polímero (MISSON et al., 2015).

A enzima pode manter a estrutura conformacional da sua forma livre, inclusive tamanho de poro, de modo que os sítios ativos da enzima podem facilitar as reações interfaciais com as moléculas de substrato.

Quando o tamanho do poro do suporte é menor do que o poro da enzima, há uma maior dificuldade da enzima entrar no poro, resultando em baixa carga de enzima imobilizada, já quando o poro do suporte é maior do que da enzima a atividade pode ser reduzida devido a desorção do suporte ou redução de estabilidade da enzima (SANG e COPPENS, 2011).

As dificuldades incluem barreiras difusionais, uma vez que os substratos podem ter acesso limitado ao sítio ativo da enzima em função do aprisionamento na rede polimérica.

Fibras nanoestruturadas são materiais promissores no aprisionamento de enzimas em função de sua elevada área, capacidade de carga e eficiência, resistência a transferência de massa e possibilidade de reuso (MISSON et al., 2015).

2.3.5 Suportes para imobilização de enzimas

As características do suporte escolhido vão ditar as condições finais do processo de imobilização. Desta forma, o estudo de diferentes tipos de suportes para imobilização de biocatalisadores, juntamente com o desenvolvimento de diferentes métodos de imobilização, com vantagens e viabilidade operacional são alvo de intensas pesquisas nos últimos anos (CARVALHO et al., 2006).

Neste item serão apresentadas as vantagens no uso de nanopartículas magnéticas e nanopartículas poliméricas como suporte para imobilização de enzimas, abordando suas formas de síntese e características individuais. Além disto, a utilização de nanopartículas magnéticas encapsuladas em matriz polimérica para a imobilização de enzimas possui como vantagem preservar as nanopartículas magnéticas em uma faixa de tamanho na qual apresentem comportamento superparamagnético, constituídas de um único domínio magnético.

2.3.5.1 Imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas

A eficiência da imobilização pode ser melhorada utilizando materiais nanoestruturados, uma vez que o tamanho submicrométrico destas nanopartículas oferece uma maior área de superfície, conseqüentemente, uma maior concentração de enzima imobilizada por unidade de massa de partículas (LI et al., 2004).

Neste contexto, a utilização de nanopartículas magnéticas como suporte em imobilização de enzimas apresenta diversas vantagens, além do tamanho submicrométrico, sua superfície pode facilmente ser

modificada para anexar diferentes grupos funcionais ou agentes biológicos. Além disto, a possibilidade de recuperação e reuso do biocatalisador torna-se bastante viável, uma vez que com a aplicação de um campo magnético a separação catalisador-produto é facilitada. As nanopartículas obtidas são estáveis, resistentes a altas temperaturas e de fácil obtenção (XIE e MA, 2009; WEI et al., 2012).

Grupos funcionais como amina, carboxilato, tiolato ou fosfato podem ser adicionados à superfície das NPMs para aumentar a estabilidade da enzima frente à imobilização. Jordan e colaboradores (2011) imobilizaram celulase em NPMs de Fe_3O_4 obtidas por co-precipitação e funcionalizadas com carbodiimida (EDC), as NPMs com enzima imobilizada foram recuperadas pela aplicação de campo magnético externo. A celulase imobilizada mostrou-se mais eficiente do que em sua forma livre frente a diferentes temperaturas e o estudo do reuso mostrou a capacidade de seis ciclos de uso após a imobilização.

2.3.5.2 Imobilização de enzimas em nanopartículas poliméricas

A maior parte dos estudos com imobilização de enzimas em partículas poliméricas mostram que as proteínas têm um tempo de imobilização muito rápido em tais materiais devido à facilidade de obtenção de partículas na faixa de 30 a 500 nm, apresentando elevada área superficial para a imobilização. Além do fato de partículas poliméricas apresentarem facilidade de reprodução em grande escala e apresentarem uma variedade de grupos reativos (MISSON et al., 2015).

Muitas vezes a ligação covalente é empregada para estabilizar a enzima nas partículas de polímero. A imobilização de enzimas em polímeros por adsorção envolve o transporte da proteína a partir da solução em massa para a região interfacial, ligação da proteína sobre o suporte e relaxamento da proteína sobre o suporte. Dados da literatura mostram que ocorre rapidamente um aumento da quantidade de enzima adsorvida em função do tempo até atingir um patamar de equilíbrio (WU et al., 2005).

Fritzen-Garcia e colaboradores (2013) realizaram um estudo da adsorção de peroxidase em nanopartículas de poliuretano funcionalizadas com polietilenoglicol 400 (PEG 400), utilizando peroxidase de raiz forte (HRP), avaliando a influência da imobilização na atividade catalítica. Diferentes concentrações de HRP (0,5-2 mg.mL^{-1}) foram adicionadas a um tampão fosfato (pH 6,5) contendo nanopartículas de PU-PEG e agitadas. Após 50 dias de armazenamento a enzima imobilizada reteve 50% de sua atividade e a concentração de

HRP adsorvida aumentou até atingir um patamar de saturação, a partir do qual permaneceu constante.

Miletic e colaboradores (2010) estudaram a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* em poliestireno sintetizado por nanoprecipitação, avaliando a influência do pH da solução tampão usada para imobilização e a atividade hidrolítica da enzima imobilizada. A maior atividade foi encontrada quando a adsorção foi realizada perto do ponto isoelétrico da lipase (pI 6,0). A atividade da enzima foi melhorada quando imobilizada, comparando com resultados da lipase comercial de *Candida antarctica*, Novozym 435.

Cipolatti e colaboradores (2014) imobilizaram a lipase B de *Candida antarctica* em nanopartículas de poli(ureia-uretano) com PEG 400, (PUU-PEG) pela reação de polimerização em miniemulsão em etapas. A enzima imobilizada reteve 67% de atividade após 4 horas de incubação a 40 °C e os diâmetros das partículas de PUU-PEG aumentaram com a incorporação de enzima no processo.

2.3.6 Aplicação de lipases imobilizadas em síntese de ésteres

Os processos industriais com base em métodos biocatalíticos são discutidos em termos de suas vantagens sobre a síntese química clássica e a extração de fontes naturais, já que aromas e fragrâncias são altamente importantes para indústrias de alimentos, cosméticos, química e farmacêutica (PAROUL et al., 2011; CHIARADIA et al., 2012).

A aplicação de lipases como catalisadores em reações de síntese orgânica apresentam diversas vantagens, entre elas a estereo e regioespecificidade e tolerância a solventes orgânicos associadas as lipases (DOMÍNGUEZ DE MARÍA et al., 2005). Como as enzimas são fatores limitantes no processo devido ao seu elevado custo, a utilização de enzimas imobilizadas em NPMs torna-se um processo atraente, uma vez que após um ciclo reacional podem ser recuperadas com um campo magnético para posterior reuso.

Reações de síntese de ésteres com a utilização de álcoois primários como substratos catalisados por lipases são encontradas na literatura (BERNARDES et al., 2007; PAROUL et al., 2010, 2011, 2012; CHIARADIA et al., 2012).

Paroul e colaboradores (2010) sintetizaram o éster de geranil propionato utilizando como catalisador a lipase comercial imobilizada de CALB, Novozym 435. Geranil propionato é um importante composto de aroma, com ampla aplicação nas áreas farmacêuticas, cosmética e

indústrias de alimentos. O álcool primário geraniol (substrato da reação) pode ser encontrado em diversos óleos essenciais, como de rosas, citronela, gerânio e limão. O mesmo grupo de pesquisa realizou a síntese do éster geranyl oleato (PAROUL et al., 2011), com propriedades semelhantes ao relatado anteriormente. Para os dois sistemas, conversões elevadas (acima de 95%) foram obtidas nas condições reacionais otimizadas.

2.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estado da arte revelou o potencial em explorar a encapsulação de magnetita em polímero via polimerização interfacial em etapas em miniemulsão, uma vez que não há relatos da encapsulação do material em polímeros desta origem, apenas em polimerizações radiculares.

Neste contexto, o presente trabalho visa a síntese de nanopartículas magnéticas de poli(ureia-uretano) via polimerização interfacial em miniemulsão utilizando diisocianato de isoforona (IPDI) e 1,6-hexanodiol como monômeros. Em etapa posterior, as NPMs de PUU sintetizadas foram utilizadas como suporte na imobilização da lipase B de *Candida antarctica* (CALB) por dois métodos de imobilização diferentes, sendo uma técnica promissora uma vez que a imobilização de enzimas em suportes magnéticos confere uma série de vantagens ao derivado obtido. Da mesma forma, não existem relatos na literatura acerca de processos de imobilização de CALB em partículas poliméricas com material magnético encapsulado obtidas por polimerização em miniemulsão.

CAPÍTULO III

3. SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE POLI(UREIA-URETANO) VIA POLIMERIZAÇÃO INTERFACIAL EM MINIEMULSÃO

3.1 INTRODUÇÃO

Nanopartículas magnéticas (NPMs) possuem propriedades eletromagnéticas e comportamento superparamagnético sob um diâmetro crítico (até 20 nm) (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003). NPMs de magnetita (Fe_3O_4) são biocompatíveis e podem ser utilizadas em aplicações biomédicas, como ressonância magnética por imagem (MRI), agentes de contraste (WEISSLEDER et al., 1995; CHOULY et al., 1996) e hipertermia (CHAN et al., 1993).

A encapsulação de NPMs em uma matriz polimérica aumenta as possibilidades de aplicações das mesmas, em função de vantagens como a proteção das NPMs pelo invólucro polimérico, o aumento da estabilidade, prevenindo a agregação e preservando o material na faixa de comportamento superparamagnético (com um único domínio magnético), e a casca polimérica pode ser funcionalizada ou carregada com um fármaco de interesse (LANDFESTER e WEISS, 2010). Entre as aplicações de NPMs encapsuladas em invólucro polimérico, as mais conhecidas são: aplicação biomédica, incluindo terapia celular, aplicação em diagnósticos (MEDEIROS et al., 2011; AKBARZADEH et al., 2012), agentes de contraste em MRI (ILLÉS et al., 2014), hipertermia (SHETE et al., 2015), liberação controlada de fármacos (TAN et al., 2005) e na imobilização de enzimas (REN et al., 2011; SOHRABI et al., 2014; WANG et al., 2014; ATACAN e ÖZACAR, 2015) com aplicação em biocatálise (MAHMOOD et al., 2013), incluindo a produção de biodiesel (XIE e MA, 2009; TRAN et al., 2012) e síntese enzimática de aromas (KHOABI et al., 2015).

Diversas técnicas podem ser empregadas para a encapsulação *in situ* de NPMs durante a síntese polimérica, incluindo polimerização em emulsão (YANASE et al., 1993), polimerização em emulsão inversa (CHEN et al., 2008), polimerização em miniemulsão inversa (XU et al., 2004; ROMIO et al., 2013) e polimerização em miniemulsão direta (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003; LU e FORCADA, 2006; STAUDT et al., 2013). Contudo, na maior parte das técnicas empregadas, a casca polimérica é composta basicamente por polímeros obtidos por polimerização em cadeia, via radicais livres, como

poliestireno e copolímeros, poli(metacrilato de metila), poliacrilamida e outros. No entanto, existem diversos outros polímeros com propriedades interessantes obtidos via polimerização em etapas, como poliuretano (PU) e poli(ureia-uretano) (PUU), que podem ser usados para a encapsulação de NPMs.

Partículas de PUU podem ser obtidas por diferentes métodos de polimerização, como polimerização interfacial em emulsão inversa (SALAÜN et al., 2011), processo de difusão-emulsão (SOUGUIR et al., 2013), polimerização interfacial em miniemulsão (VALÉRIO et al., 2015), polimerização interfacial em miniemulsão inversa (CRESPY et al., 2007; ROSENBAUER et al., 2009) e polimerização em miniemulsão (TIARKS et al., 2001; GAUDIN e SINTES-ZYDOWICZ, 2011; CIPOLATTI et al., 2014; VALÉRIO et al., 2014). Apesar de sua flexibilidade e interessantes aplicações, a encapsulação de NPMs de Fe_3O_4 em poliuretano e poli(ureia-uretano) não foi reportada anteriormente na literatura.

Neste trabalho, NPMs superparamagnéticas foram encapsuladas em PUU por polimerização interfacial em miniemulsão. As NPMs foram sintetizadas pelo método de co-precipitação e funcionalizadas com ácido oleico (AO) para permitir a dispersão das NPMs na fase orgânica antes da miniemulsificação. A polimerização em miniemulsão de PUU foi conduzida utilizando diisocianato de isoforona (IPDI) na fase dispersa e 1,6-hexanodiol na fase contínua. Nanopartículas magnéticas de PUU foram analisadas por Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), termogravimetria (TGA), magnetometria (MAV) e por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os reagentes e procedimentos experimentais utilizados, bem como as técnicas empregadas na caracterização dos materiais obtidos nas reações de síntese de nanopartículas de magnetita, nanopartículas de poli(ureia-uretano) e nas reações de encapsulação de magnetita em poli(ureia-uretano).

3.2.1 Materiais

A síntese de nanopartículas de magnetita (Fe_3O_4) foi realizada utilizando como reagentes: água destilada (H_2O), cloreto férrico ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, P.A 97%), sulfato ferroso ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, P.A 99%),

hidróxido de amônio (NH_4OH , P.A 99%), ácido oleico (P.A 99%) e etanol (P.A 99%), adquiridos da Vetec. As nanopartículas de poli(ureia-uretano) foram preparadas utilizando diisocianato de isoforona (IPDI, 98%) e 1,6-hexanodiol (97%) como monômeros, ambos adquiridos da Sigma-Aldrich. Crodamol GTCC (Alfa Aesar) foi utilizado como agente hidrofóbico em algumas reações. Dodecil sulfato de sódio (SDS, Vetec) foi utilizado como surfactante e ciclohexano (Sigma-Aldrich, P.A 99%) como solvente para solubilizar o monômero IPDI. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos.

3.2.2 Métodos

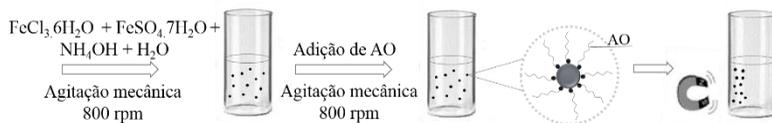
3.2.2.1 Síntese das nanopartículas de magnetita

As nanopartículas de Fe_3O_4 foram obtidas pelo método de co-precipitação em meio aquoso, reportado anteriormente por Feuser e colaboradores (2015). $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (5 g) e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (6 g) foram dissolvidos em 140 mL de água destilada usando um agitador mecânico (Fisaton 713) com impelidor tipo hélice a uma rotação de 800 rpm. Em seguida, hidróxido de amônio (11 mL) foi adicionado rapidamente formando uma mistura escura que permaneceu sob agitação mecânica durante 40 minutos.

3.2.2.2 Modificação da superfície das nanopartículas de Fe_3O_4

Após a síntese das nanopartículas magnéticas (NPMs) descritas na seção anterior, ácido oleico (AO) foi adicionado para evitar a agregação entre as partículas e hidrofobizar a superfície para posterior encapsulação das NPMs em polímero hidrofóbico. AO (20 mL) foi adicionado ao precipitado escuro obtido e mantido sob agitação mecânica (Fisaton 713) durante 30 minutos. As nanopartículas modificadas com ácido oleico (NPMs-AO) foram separadas pela aplicação de um campo magnético externo, lavadas com etanol e centrifugadas (centrífuga Centribio 80-2B) a 4000 rpm por 20 minutos para a remoção do ácido oleico em excesso. A Figura 12 ilustra o método utilizado para o preparo e modificação da superfície das NPMs.

Figura 12 - Representação esquemática da síntese das NPMs revestidas com ácido oleico.



Fonte: Autor (2015).

3.2.2.3 Encapsulação das NPMs em nanopartículas de poli(ureia-uretano) via polimerização em miniemulsão

O procedimento utilizado para o preparo das nanopartículas de poli(ureia-uretano), (PUU), com a incorporação de NPMs foi baseado na polimerização em etapas via miniemulsão descrita anteriormente por Valério e colaboradores (2014) para a síntese de nanopartículas de PUU puras. As reações foram conduzidas utilizando IPDI como diisocianato e 1,6-hexanodiol como polioliol. As concentrações de IPDI e polioliol foram avaliadas em duas razões molares diferentes de NCO:OH (1,5:1 e 2,5:1) e a utilização de Crodamol como coestabilizador foi investigada em algumas reações. As formulações utilizadas nas polimerizações em miniemulsão estão representadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Formulações das reações de miniemulsão. *

Reagentes e condições	M0	M1	M2	M3	M4	M5
IPDI (g)	4,9	2,21	4,9	4,9	4,9	4,9
1,6-hexanodiol (g)	1,07	1,05	1,07	1,07	1,07	1,07
Ciclohexano (mL)	5	2	5	5	5	5
SDS (g)	0,6	0,2	0,6	0,6	0,6	0,6
Crodamol (g)	-	-	-	-	1,08	1,28
NPMs-AO (g)	-	0,11 ^a	0,24 ^a	0,49 ^b	0,49 ^c	1,5 ^d
(NCO:OH)	2,5:1	1,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1	2,5:1

* Todas as miniemulsões foram preparadas com 20 mL de água;

^a 5% em massa, ^c 10% em massa e ^d 30% em massa em relação ao IPDI: NPMs-AO adicionadas antes da sonificação;

^b 10% em massa em relação ao IPDI com dois métodos diferentes: NPMs-AO adicionadas durante a sonificação e adicionadas antes da sonificação

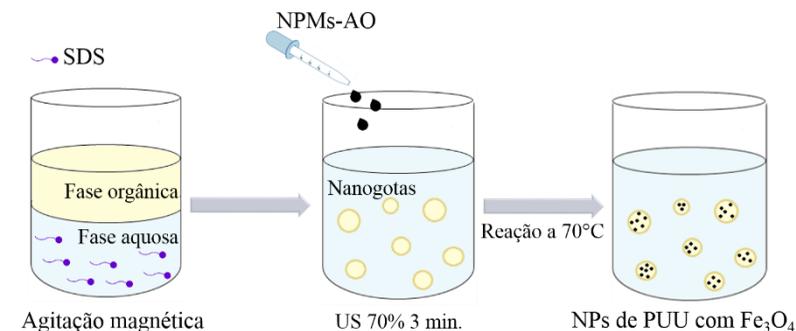
A fase contínua (aquosa) foi constituída do polioliol 1,6-hexanodiol, surfactante SDS e água, enquanto que a fase dispersa (orgânica) foi

constituída por IPDI, ciclohexano, Crodamol (quando avaliado seu efeito) e NPMs-AO.

Dois métodos diferentes foram utilizados para a adição das NPMs ao meio reacional. No primeiro, as NPMs-AO foram dispersas em ciclohexano e gotejadas durante a sonicação, conforme ilustrado na Figura 13. A segunda metodologia consistiu em adicionar as NPMs-AO diretamente na fase orgânica, antes da sonicação (Figura 14).

Quando as NPMs-AO foram adicionadas durante a sonicação, a fase orgânica foi adicionada a fase aquosa sob agitação magnética (IKA Color Squid) por 20 minutos a temperatura ambiente. As nanogotas, contendo IPDI e ciclohexano, foram formadas por uma elevada força de cisalhamento pela sonicação da emulsão (previamente formada) durante 180 segundos com 70% de amplitude em regime de pulso (5 segundos de sonicação/2 segundos de pausa), usando um dispersor ultrassônico (Fisher-Scientific-Ultrasonic Dismembrator 500, 400 W). As NPMs-AO dispersas em ciclohexano foram adicionadas lentamente ao meio reacional com um conta gotas durante o tempo de sonicação.

Figura 13 - Encapsulação das NPMs-AO (adicionadas durante a sonicação) via polimerização interfacial em miniemulsão.



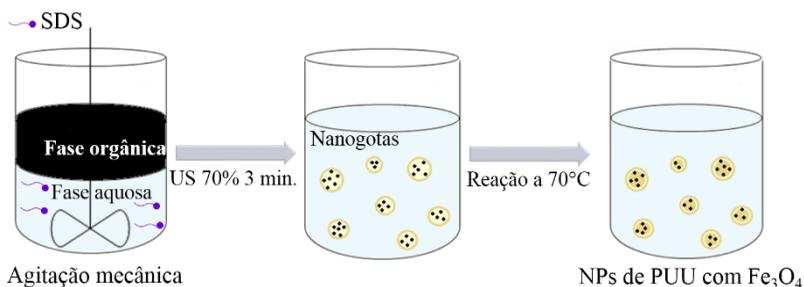
Fonte: Autor (2015).

Quando adicionadas antes da sonicação, as NPMs-AO foram dispersas diretamente na fase orgânica, juntamente com o IPDI, Crodamol (quando utilizado) e ciclohexano. Para facilitar a dispersão das NPMs-AO na fase orgânica foi utilizado um banho de ultrassom (Unique, Maxiclean Modelo 750) durante 15 minutos.

Após a dispersão em banho de ultrassom, a fase orgânica foi adicionada à fase aquosa e mantida sob agitação mecânica (Dist Di-12)

durante 20 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as nanogotas contendo IPDI, ciclohexano, Crodamol (quando utilizado) e NPMs-AO foram formadas pela sonicaco da emulso previamente formada durante 180 segundos com 70% de amplitude em regime de pulso (5 segundos de sonicaco/2 segundos de pausa) usando um dispersor ultrassnico (Fisher-Scientific-Ultrasonic Dismembrator 500, 400 W).

Figura 14 - Encapsulao das NPMs-AO (adicionadas antes da sonicaco) via polimerizao interfacial em miniemulso.



Fonte: Autor (2015).

Concentraes de 5, 10 e 30% em massa de NPMs-AO em relao ao monmero hidrofbico (IPDI) foram avaliadas. Para evitar a polimerizao durante a sonicaco, a miniemulso foi resfriada em banho de gelo. As reaes de polimerizao foram realizadas em ampolas de 20 mL imersas em banho termosttico a temperatura constante de 70 °C durante 3 horas.

3.2.3 Caracterizao

3.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada utilizando um espectrmetro IR Prestige-21 da marca Shimadzu, alocado no Laboratrio de Controle e Processos e Polimerizao (LCP) da UFSC. A anlise foi realizada com a finalidade de verificar os produtos finais da reao, avaliando o consumo do grupo isocianato (NCO) e a formao das ligaes ureia-uretano, assim como o aparecimento da ligao Fe-O identificando a presena de óxido de ferro (Fe_3O_4).

Após a polimerização, o látex obtido foi centrifugado a 8000 rpm (4293 g) por 10 minutos (Centrífuga Eppendorf AG 22331 70 W) e o sobrenadante foi removido a fim de analisar somente nanopartículas de PUU com material magnético encapsulado. Para as análises, as amostras foram compactadas com brometo de potássio (KBr) e analisadas com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 varreduras em um intervalo de $4000\text{--}400\text{ cm}^{-1}$.

3.2.3.2 Decomposição térmica

A decomposição térmica foi avaliada por análise termogravimétrica (TGA) utilizando um equipamento da marca NETZSCH (TG 449 F3 Jupiter) alocado no Laboratório de Controle e Processos e Polimerização (LCP) da UFSC. Após a polimerização, o látex obtido foi centrifugado a 8000 rpm (4293 g) por 10 minutos (Centrífuga Eppendorf AG 22331 70 W) e o sobrenadante foi removido a fim de analisar somente nanopartículas de PUU com material magnético encapsulado. Aproximadamente 10 mg de cada amostra foram pesados em uma panela de platina, a taxa de aquecimento utilizada durante a análise foi de 25 a $800\text{ }^{\circ}\text{C}$ em atmosfera de nitrogênio a 20 mL/min.

3.2.3.3 Propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas das NPMs-AO e PUU com NPMs-AO encapsuladas foram medidas utilizando um magnetômetro de amostra vibrante, (MAV), (3473-70, VSM) a 300 K alocado no Laboratório Multiusuário de Caracterização Magnética de Materiais da UFSC. Após a polimerização, o látex obtido foi centrifugado a 8000 rpm (4293 g) por 10 minutos (Centrífuga Eppendorf AG 22331 70 W) e o sobrenadante foi removido a fim de analisar somente nanopartículas de PUU com material magnético encapsulado. Aproximadamente 4 mg de cada amostra foram pesados em uma cápsula de vidro que foi fixada verticalmente entre duas bobinas. O campo magnético aplicado foi variado entre -20 a 20 kOe .

3.2.3.4 Morfologia e tamanho de partícula

A análise para verificação da morfologia, diâmetro médio e distribuição do tamanho de partícula foi realizada pela técnica de

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), em um equipamento da marca JEOL, modelo JEM-1011, com voltagem de aceleração máxima de 100 kV e faixa de magnificação de 50 a 600.000 vezes, e por Microscopia Eletrônica de varredura com emissão de campo (MEV-FEG) em um equipamento da marca JEOL JSM-6701F, com tensão de aceleração de 0,5 a 30 kV e faixa de magnificação de 25 a 650.000 vezes, ambos alocados no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para as análises de MET, a fração magnética dos látices, atraída por um campo magnético externo, foi diluída em água destilada (1:100) e uma gota da amostra diluída foi gotejada em um grid de cobre recoberto com parlódio e seca a temperatura ambiente. Para as análises de MEV-FEG o látex total foi liofilizado, disposto sobre um stub e coberto com uma fina camada ouro.

O diâmetro médio (em número) das partículas de polímero e das NPMs-AO, (D_{p_n}), o diâmetro médio em massa, (D_{p_w}) e o índice de polidispersão (PdI) foram calculados pelo programa SizeMeter[®] pelas imagens de MET. Após a obtenção da distribuição de tamanho das partículas, o D_{p_n} foi calculado conforme equação 3, a partir do somatório do produto do número de partículas de diâmetro D_i pelo valor deste diâmetro (D_{p_i}) e dividido pelo número total de partículas (LOVELL e EL-AASSER, 1997).

$$D_{p_n} = \frac{\sum niD_{p_i}}{\sum ni} \quad (3)$$

O PdI foi calculado (Equação 5) pela razão entre o diâmetro médio em massa (Equação 4) e o diâmetro médio numérico (Equação 3).

$$D_{p_w} = \frac{\sum niD_{p_i}^4}{\sum niD_{p_i}^3} \quad (4)$$

$$PdI = \frac{D_{p_w}}{D_{p_n}} \quad (5)$$

O diâmetro médio (em intensidade) das gotas de monômero (D_g) e das partículas de polímero (D_p) e o índice de polidispersão (PdI) foram determinados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering-DLS) utilizando o equipamento Zetasizer

Nano S ZEN1600 (ângulo do feixe incidente de 173° e comprimento de onda do laser de 633nm), da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle e Processos de Polimerização (LCP) da UFSC. As leituras foram feitas pela diluição do látex em água destilada (1:10) e os valores finais foram expressos pela média de duas medidas.

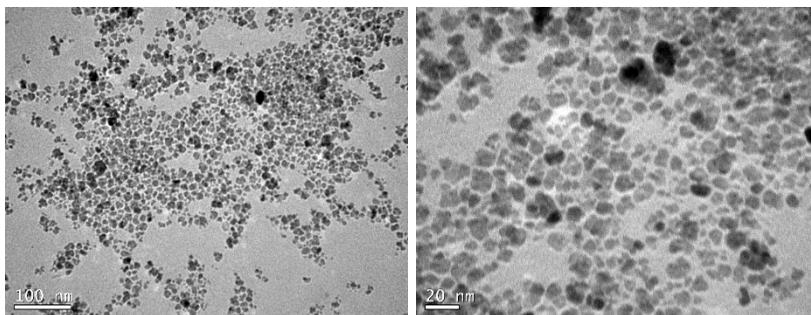
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Síntese das NPMs funcionalizadas com ácido oleico

3.3.1.1 Morfologia e tamanho de partícula

A técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão foi utilizada para avaliação da estrutura das NPMs de magnetita (NPMs Fe_3O_4) recobertas com ácido oleico. A Figura 15 apresenta as micrografias de MET das NPMs obtidas pelo método de co-precipitação e hidrofobizadas com ácido oleico.

Figura 15 - Micrografias de MET das NPMs revestidas com AO.



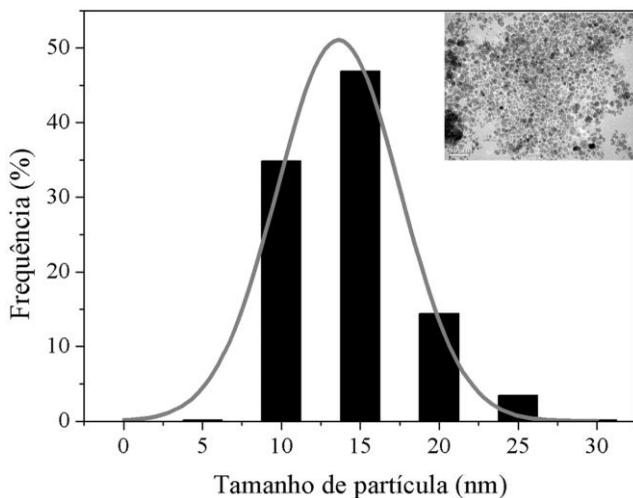
Em função de seu caráter hidrofílico, nanopartículas inorgânicas, como o óxido de ferro, necessitam ser funcionalizadas para evitar a aglomeração entre as partículas (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003; LU e FORCADA, 2006) e torná-las mais hidrofóbicas, permitindo sua dispersão em monômeros orgânicos, como o IPDI. Esta estabilização das NPMs pode ser feita pela adsorção de um surfactante, chamado surfactante secundário, uma vez que este não pode interferir no uso do surfactante primário (utilizado para estabilizar as partículas poliméricas nas reações de miniemulsão) (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003), por exemplo, o dodecil sulfato de sódio (SDS).

O diâmetro médio numérico das NPMs-AO sintetizadas pode ser verificado na Tabela 2. As nanopartículas apresentam Dp_n de 14,3 nm e Dp_w de 17,8 nm. Analisando o gráfico de distribuição de tamanho de partícula (Figura 16), é possível observar um máximo em 15 nm.

Tabela 2 - Diâmetros médios e PDI das NPMs-AO.

Amostra	Dp_n (nm)	Dp_w (nm)	PdI
NPMs-AO	14,3	17,8	1,23

Figura 16 - Distribuição dos tamanhos de partícula NPMs-AO, baseado nas micrografias de MET (*figura superior direito*).



O tamanho de partícula obtido é menor do que o diâmetro médio crítico (20 nm) em que NPMs Fe_3O_4 apresentam comportamento superparamagnético (SALUNKHE et al., 2014). Desta forma, as NPMs-AO sintetizadas apresentam um único domínio magnético quando expostas a um campo magnético externo.

3.3.1.2 Comportamento térmico

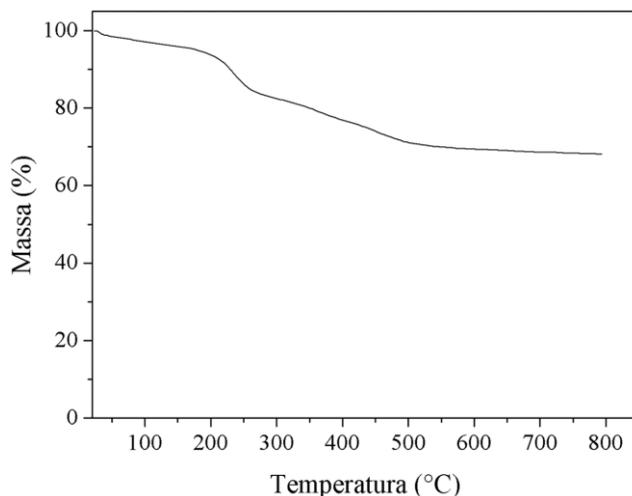
Os resultados da análise termogravimétrica (TGA) apresentaram dois diferentes estágios de degradação para as NPMs-AO sintetizadas, o primeiro entre 200 a 260 °C e o segundo entre 260 a 480

°C. O primeiro estágio corresponde ao ácido oleico livre e o segundo ao ácido oleico adsorvido quimicamente as NPMs, devido à interação entre o carboxilato e o átomo de metal. O mesmo comportamento foi verificado quando Ramírez e Landfester (2003) hidrofobizaram NPMs de Fe_3O_4 com ácido oleico, apresentando dois estágios de degradação nas faixas entre 200 a 280 °C e 380 a 480 °C.

A baixa perda de massa abaixo de 200 °C está relacionada à remoção de moléculas de água e outros componentes fisicamente adsorvidos (JIANG et al., 2014). Khoobi et al. (2015) observaram comportamento semelhante na síntese de NPMs de Fe_3O_4 , e a perda de massa abaixo de 250 °C foi atribuída à dessorção de água e solventes orgânicos aplicados nas etapas de síntese.

A fração final em massa de NPMs presente no material sintetizado corresponde a 68%, desta forma 32% é equivalente ao AO ligado na superfície das NPMs e outros componentes (Figura 17).

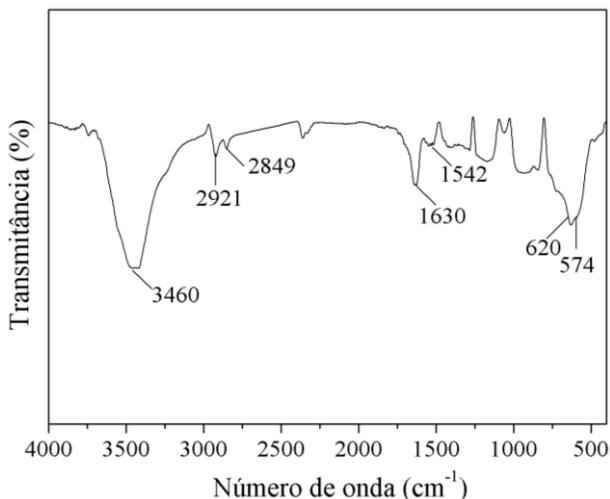
Figura 17 - Análise termogravimétrica das NPMs-AO.



3.3.1.3 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi utilizada para a verificação da ligação das NPMs de Fe_3O_4 com AO após a modificação da superfície, e os resultados obtidos são apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Espectro de FTIR das NPMs recobertas com ácido oleico.



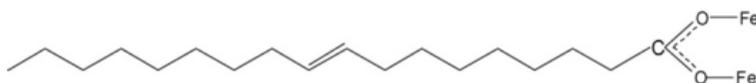
A banda de absorção com picos localizado em 3460 cm^{-1} indica a presença de água residual na amostra (MA et al., 2003). As nanopartículas recobertas com AO, apresentaram pico de absorção em 2921 e 2849 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento assimétrico CH_2 e ao estiramento simétrico CH_2 . As bandas com picos de absorção em 1542 e 1630 cm^{-1} , são características do estiramento de ν_{as} assimétrica (COO^-) e ν_{s} (COO^-) simétrica. As bandas de absorção em baixos números de onda ($< 700 \text{ cm}^{-1}$) foram atribuídas para as vibrações de ligações de Fe-O, a presença de NPMs pode ser observada por dois picos de absorção em 620 e 574 cm^{-1} .

Zhang e colaboradores (2006) estudaram a interação entre nanopartículas de óxido de ferro e ácido oleico por análise de FTIR. Pelos espectros de ácido oleico, AO, puro e NPMs recobertas com AO, os autores observaram o desaparecimento do pico com absorção em 1710 cm^{-1} (presente em AO puro) nas NPMs-AO, dando origem a picos com absorção em 1541 e 1639 cm^{-1} . Este resultado indica o padrão de ligação dos ácidos carboxílicos na superfície das NPMs pela combinação de moléculas ligadas simetricamente e moléculas ligadas a um ângulo sob a superfície das NPMs. Desta forma, os resultados revelaram que o AO foi adsorvido nas NPMs por quimissorção. Segundo os autores, a interação entre o carboxilato e o átomo de metal pode ser classificada por quatro tipos: monodentados, pontes

(bidentados), quelantes (bidentados) e interação iônica. A separação do número de onda, Δ , entre as bandas ν_{as} (COO-) e ν_s (COO-) pode ser usada para distinguir as diferentes categorias de interação. Valores de Δ entre 200-320 cm^{-1} correspondem a interação monodentada, em $\Delta < 110 \text{ cm}^{-1}$ à interação bidentada-quelante e em Δ entre 140-190 cm^{-1} a bidentada em ponte.

Desta forma, no presente trabalho o Δ encontrado foi $< 110 \text{ cm}^{-1}$ ($1630 - 1542 = 88 \text{ cm}^{-1}$) sendo a interação caracterizada como bidentada-quelante, onde a interação entre o COO- e o átomo de Fe é covalente. A mesma interação foi descrita por Zhang e colaboradores (2006), e o esquema envolvido na interação pode ser visualizado na Figura 19.

Figura 19 - Interação bidentada-quelante entre o grupo COO- do AO e o átomo de metal Fe.



Fonte: Zhang et al. (2006).

3.3.1.4 Propriedades magnéticas

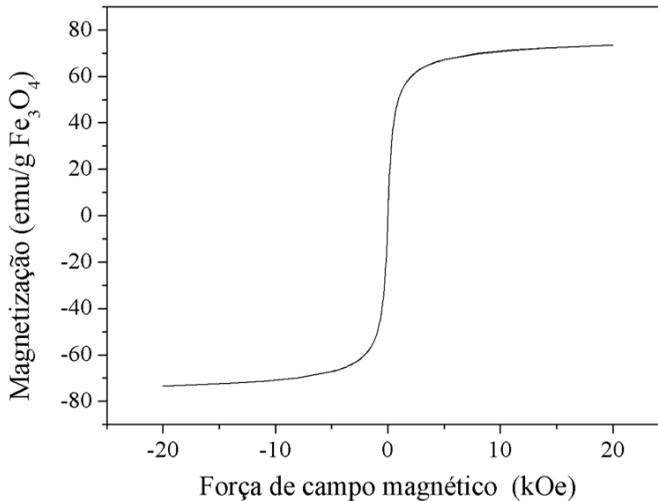
Materiais magnéticos são caracterizados pela sua habilidade na resposta a um campo magnético externo. As propriedades magnéticas das NPMs-AO foram medidas por MAV a 300 K e o resultado pode ser visualizado na Figura 20. Os parâmetros coercitividade, H_c , magnetização remanescente, M_r , magnetização de saturação, M_s , e razão de perpendicularidade, M_r/M_s , estão listados na Tabela 3.

O valor de M_s encontrado para as nanopartículas de Fe_3O_4 -AO foi de 73,5 emu/g e os baixos valores de H_c (0,162 Oe) e M_r/M_s ($2,99 \times 10^{-7}$) indicam comportamento superparamagnético. Cada partícula de NPM-AO corresponde a um único domínio cristalino, apresentando uma única orientação quando um campo magnético é aplicado (LU e FORCADA, 2006). Essa propriedade é atribuída em função do tamanho de partícula na faixa de 5 a 25 nm.

Tabela 3 - Propriedades magnéticas das NPMs-AO.

Amostra	H_c (Oe)	M_r (emu/g Fe_3O_4)	M_s (emu/g Fe_3O_4)	M_r/M_s ($\times 10^{-7}$)
NPMs-AO	0,162	0,022	73,5	2,99

Figura 20 - Curva de magnetização das NPMs-AO.



O valor de M_s (73,5 emu/g) obtido para as NPMs-AO é menor que o valor de 89 emu/g reportado na literatura para nanopartículas de Fe_3O_4 puras (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003). Este fato está relacionado à formação parcial de outros materiais como $\gamma-Fe_2O_3$ (maghemita) ou $\alpha-Fe$ (ferrita), uma vez que as NPMs de Fe_3O_4 apresentam caráter pirofórico devido a sua elevada área superficial, podendo oxidar em contato com o ar (SUN e ZENG, 2002; SI et al., 2004).

O resultado obtido na Figura 20, indica que as NPMs-AO apresentam comportamento superparamagnético, com ausência de curva de histerese, desta forma as NPMs-AO podem ser utilizadas em uma infinidade de processos, como aplicações biomédicas (WEISSLEDER et al., 1995; MEDEIROS et al., 2011; SALUNKHE et al., 2014) e sistemas para imobilização de enzimas (LU e FORCADA, 2006; XIE e MA, 2009; TRAN et al., 2012; WANG et al., 2014). O comportamento frente

a um campo magnético externo pode ser melhor visualizado na Figura 21.

Figura 21 - NPMs-AO em etanol sem a aplicação de um campo magnético externo e com a aplicação de um campo magnético externo.



3.3.2 Síntese das nanopartículas de poli(ureia-uretano)

Inicialmente, a reação de formação de PUU foi realizada sem a adição de NPMs-AO, conforme descrito na literatura por Valério e colaboradores (2014). Dodecil sulfato de sódio foi utilizado como surfactante para prevenir a coalescência das gotas e garantir a estabilidade da miniemulsão. Para facilitar a dispersão do monômero IPDI, ciclohexano foi adicionado à fase dispersa. A Tabela 4 apresenta o tamanho médio das gotas (D_g) e das partículas (D_p) analisadas por DLS das NPs de PUU sem adição da carga inorgânica, reação M0.

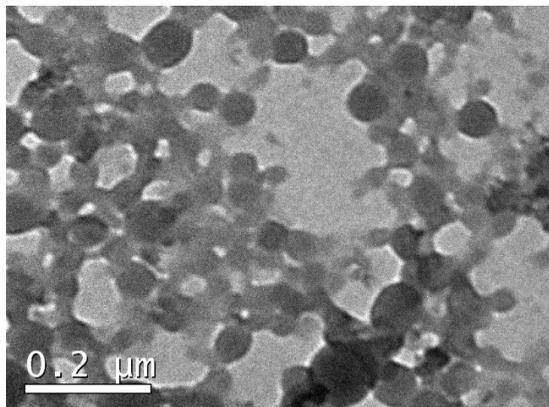
Tabela 4 - Diâmetro médio em intensidade das gotas (D_g) e das partículas (D_p) de PUU puro e índice de polidispersão (PdI) medidos por DLS.

Amostra	D_g (nm)	PdIg	D_p (nm)	PdIp
PUU puro	$91,6 \pm 1,9$	0,143	$100,5 \pm 1,5$	0,174

D_g e D_p permaneceram em faixas de tamanho similares, o que significa que a miniemulsão permaneceu estável durante a reação de polimerização e que as gotas (e interface das gotas) foram o principal *locus* de polimerização, como esperado para uma reação em miniemulsão.

Os valores de diâmetro de partícula obtidos por DLS corroboram o resultado apresentado para análise de MET (Figura 22) com elevado número de partículas na faixa entre 90 e 100 nm.

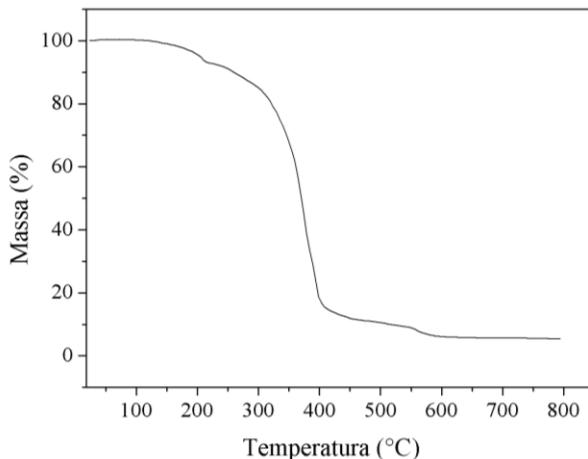
Figura 22 - Micrografia de MET das NPs de PUU.



3.3.2.1 Comportamento térmico do PUU

A degradação das NPs de PUU sem a adição de NPMs-AO é caracterizada por dois estágios de redução de massa (Figura 23), uma com início em 200 °C e outra com início em 400 °C, a primeira associada à decomposição dos segmentos compostos pelo polioliol, e a segunda pela decomposição dos segmentos compostos pelo diisocianato (ZHANG et al., 2014). A baixa perda de massa abaixo de 200 °C está relacionada à remoção de moléculas de água e outros componentes fisicamente adsorvidos.

Figura 23 - Análise termogravimétrica das NPs de PUU.



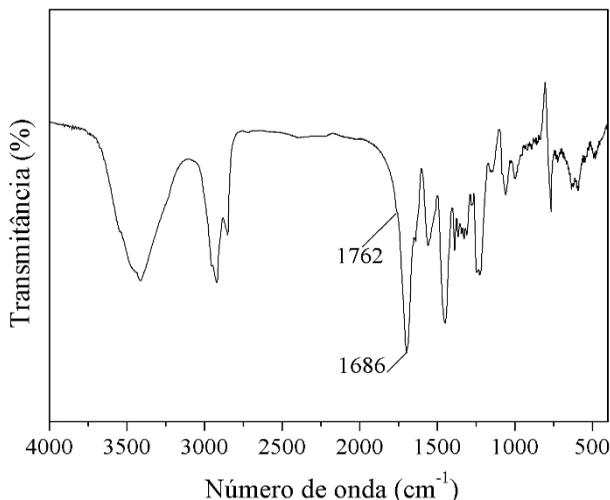
3.3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi utilizada para a verificação da formação de PUU (reação M0) após a reação de polimerização em etapas via miniemulsão e os resultados obtidos são apresentados na Figura 24.

A banda de absorção com a localização de pico em 3400 cm^{-1} indica a presença de grupamentos hidroxila provenientes do 1,6-hexanodiol e água. A ausência de banda de absorção localizada em 2270 cm^{-1} , correspondente ao grupo isocianato ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$), confirma o consumo total de isocianato durante a reação de polimerização.

As bandas de absorção com picos localizados em 1762 e 1686 cm^{-1} são atribuídas respectivamente ao grupo uretano ($\text{C}=\text{O}$) e ao grupo ureia ($-\text{N}-\text{H}$), identificando a formação de poli(ureia-uretano) durante a reação de polimerização. Resultados semelhantes foram reportados por Valério e colaboradores (2014) em relação à formação de PUU e consumo de isocianato após reação de polimerização em miniemulsão utilizando óleo de mamona e poli(ϵ -caprolactona), (PCL), como poliois e diisocianato de isoforona, IPDI, como diisocianato, respectivamente.

Figura 24 - Espectro de FTIR das NPs de PUU (reação M0).



3.3.3 Encapsulação das NPMs-AO em PUU por polimerização interfacial em etapas via miniemulsão

A síntese das nanopartículas de poli(ureia-uretano) superparamagnéticas foi realizada por polimerização interfacial em miniemulsão. Como descrito na seção 3.2.2.1 e 3.2.2.2, as NPMs de Fe_3O_4 foram obtidas por co-precipitação e hidrofobizadas com ácido oleico. A síntese das nanopartículas de PUU foi realizada usando IPDI e 1,6-hexanodiol como monômeros e as NPMs-AO foram incorporadas ao PUU *in situ* durante a polimerização.

Após a incorporação das NPMs-AO na fase orgânica a miniemulsão permaneceu estável e a estabilidade foi garantida mesmo após a polimerização, sem separação de fases entre polímero formado e NPMs não encapsuladas. Nas reações de polimerização usando 1,6-hexanodiol como polioliol, o diol é disperso na fase contínua (aquosa) e o IPDI na fase dispersa (orgânica), dentro das gotas, e a polimerização ocorre na interface óleo:água entre o grupo funcional hidroxila, proveniente do 1,6-hexanodiol, e o grupo isocianato, proveniente do IPDI, formando as ligações uretano. Em adição a esta reação principal, parte do grupo isocianato pode também reagir com as moléculas de água, formando grupos amina, que por sua vez reagem com outro

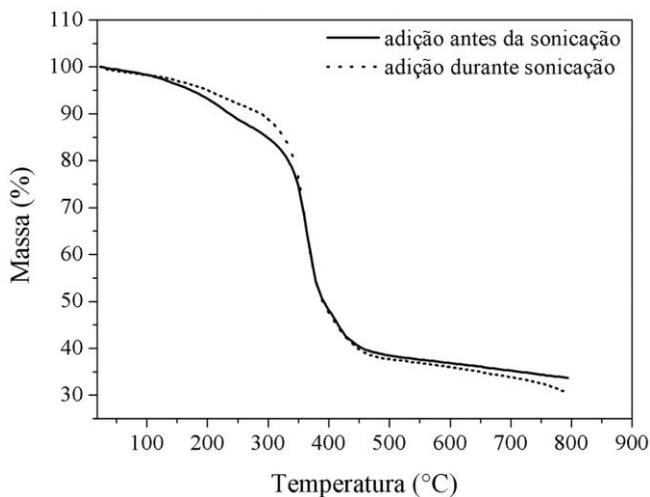
grupamento isocianato formando as ligações ureia, Figura 9 no item 2.2.2.

3.3.3.1 Comportamento térmico

Dois métodos diferentes foram avaliados para a adição das NPMs-AO na fase orgânica. No primeiro, as NPMs-AO foram adicionadas durante a sonicação, e no segundo método, as NPMs-AO foram adicionadas na fase orgânica antes da sonicação.

A quantidade de NPMs-AO que foram efetivamente incorporadas nas NPs de PUU foram determinadas por análise de TGA. A Figura 25 mostra a análise das NPs de PUU com NPMs-AO usando a mesma formulação (reação M3), mas com diferentes métodos de adição das NPMs-AO.

Figura 25 - Análise termogravimétrica da reação M3 (NPMs-AO adicionadas durante a sonicação e antes da sonicação).



Abaixo de 250 °C, as amostras tiveram uma ligeira perda de massa, devido à remoção de moléculas de água fisicamente adsorvidas e outros componentes. Os dois métodos de adição mostraram comportamento similar para a reação com 10% em massa (em relação ao IPDI) de NPMs-AO incorporadas em PUU. Neste caso, a perda de massa foi deslocada para temperaturas mais elevadas quando em comparação com o PUU puro (seção 3.3.2.1), devido à maior

estabilidade na presença das NPMs-AO. A fração em massa de Fe_3O_4 em NPs de PUU foi de 31% para NPMs-AO adicionadas durante a sonicação e 34% quando adicionadas antes da sonicação.

A fração em massa de Fe_3O_4 nas NPs de PUU, como observado na Figura 25, foi maior do que a relação Fe_3O_4 /monômero inicial, uma vez que a análise foi realizada após a centrifugação do látex total. Durante a centrifugação, as NPs de PUU sem material inorgânico incorporado tendem a migrar para o sobrenadante, em função de sua menor densidade em relação às NPs de PUU com NPMs-AO incorporadas.

A partir de análise gravimétrica do sobrenadante e do precipitado foi possível detectar a quantidade de polímero com Fe_3O_4 incorporada. Desta forma, cerca de 6; 16 e 57% das NPs de PUU formadas para concentrações de NPMs-AO de 5, 10 e 30% em massa em relação ao IPDI, apresentaram magnetita incorporada. Portanto, o precipitado que foi caracterizado por TGA continha uma maior quantidade de NPMs-AO que a relação magnetita/monômero inicial.

A eficiência de encapsulação foi similar para ambos os métodos de adição de NPMs-AO, assim, as reações seguintes foram realizadas somente com a adição das NPMs-AO diretamente na fase orgânica, antes da sonicação, a fim de simplificar o processo de síntese.

Ramírez e Landfester (2003) obtiveram 40% em massa de NPMs de Fe_3O_4 encapsuladas em NPs de poliestireno por uma rota de preparação em três etapas, incluindo dois processos de miniemulsificação. Primeiro, foram sintetizadas as NPMs e funcionalizadas com AO, em seguida as NPMs-AO foram dispersas em octano e miniemulsificadas em água contendo SDS, a fim de formar agregados de NPMs de Fe_3O_4 revestidos com dupla camada de surfactante (ácido oleico/SDS). Estes foram miniemulsificados com o monômero para a obtenção de polímero com agregados de magnetita encapsulada.

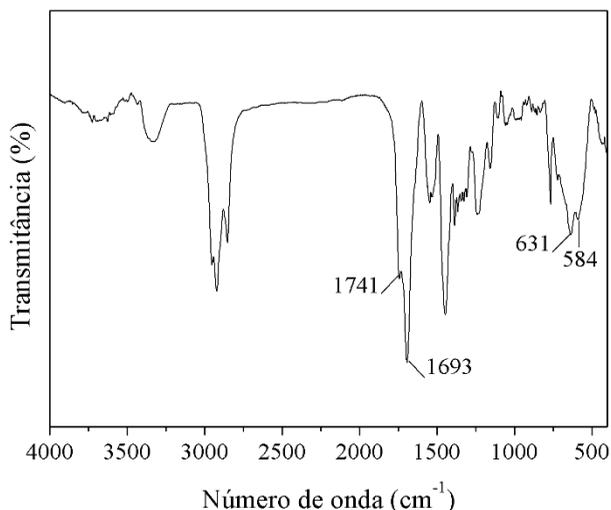
3.3.3.2 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi utilizada para a verificação da formação de PUU com NPMs-AO encapsuladas após a reação de polimerização em etapas via miniemulsão.

A Figura 26 mostra o espectro da reação M2 com 5% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI na matriz polimérica de PUU.

A banda de absorção com a localização de pico em 3500 cm^{-1} indica a presença de grupamentos hidroxila provenientes do 1,6-hexanodiol e água. A ausência de banda de absorção localizada em 2270 cm^{-1} , correspondente ao grupo isocianato ($\text{N}=\text{C}=\text{O}$), confirma o consumo total de isocianato durante a reação de polimerização.

Figura 26 - Espectro de FTIR das NPs de PUU com 5% de NPMs-AO em massa (em relação ao IPDI), (reação M2).



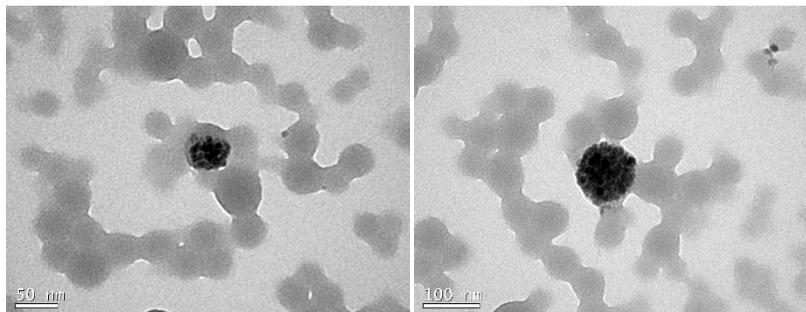
As bandas de absorção com picos localizados em 1741 e 1693 cm^{-1} são atribuídas respectivamente ao grupo uretano ($\text{C}=\text{O}$) e ao grupo ureia ($-\text{N}-\text{H}$), identificando a formação de poli(ureia-uretano) durante a reação de polimerização. As bandas de absorção localizadas em 631 e 584 cm^{-1} correspondem a vibrações características de ligações Fe-O das NPs de Fe_3O_4 , e podem ser vistas no espectro das NPs magnéticas de PUU.

3.3.3.3 Tamanho e morfologia das partículas de PUU com NPMs-AO

As NPs de PUU com NPMs-AO atraídas por um campo magnético externo foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão para análise de morfologia e tamanho de partícula. As imagens de MET das NPs de PUU com 5% em massa de NPMs-AO (reação M2) são apresentadas na Figura 27. Como pôde ser observado,

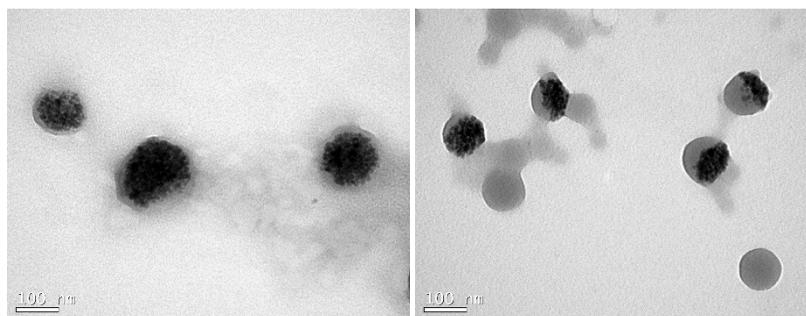
poucas partículas de polímero contêm NPMs-AO incorporadas, sendo a maior parte composta por PUU puro.

Figura 27 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 5% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI (reação M2).



Quando a concentração de NPMs-AO é elevada para 10% em massa (reação M3), o tamanho de partícula aumenta, assim como a fração de NPs de PUU contendo NPMs-AO, como pode ser visto na Figura 28.

Figura 28 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 10% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI (reação M3).



Na reação M4, utilizando 10% de NPMs-AO e 17% de crodamol em relação à fase orgânica, um grande número de NPs de PUU com material inorgânico incorporado foi obtido, como apresentado nas imagens de MET (Figura 29).

Quando a concentração de 30% de NPMs-AO foi utilizada (reação M5) com 17% de Crodamol na formulação, a análise de MET

mostrou NPs com alto nível de encapsulação na maioria das partículas de polímero (Figura 30). Em adição, não foram observadas NPMs-AO livres nas imagens de MET, embora uma pequena fração permaneceu na parede do reator após o processo de miniemulsificação para as diferentes concentrações de NPMs-AO estudadas.

Figura 29 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 10% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI e 17% de Crodamol (reação M4).

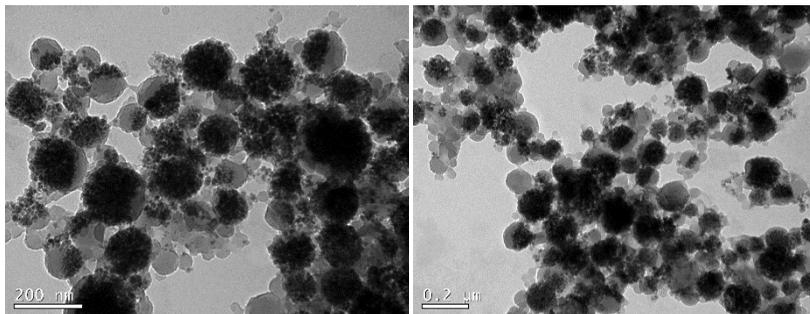
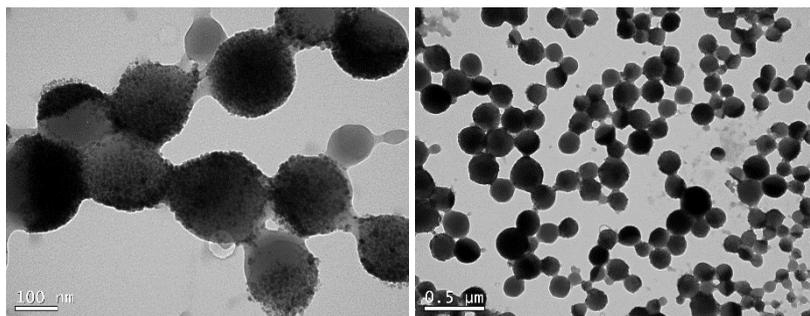


Figura 30 - Micrografias de MET das NPs de PUU com relação teórica de 30% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI e 17% de Crodamol (reação M5)



O fato da reação entre o IPDI e o 1,6-hexanodiol ocorrer na interface pode favorecer a encapsulação, uma vez que através da reação entre os grupos funcionais na interface das gotas, é formada uma casca polimérica de PUU. Esta por sua vez reduz a mobilidade das NPMs-AO, minimizando a possibilidade destas migrarem para a fase aquosa.

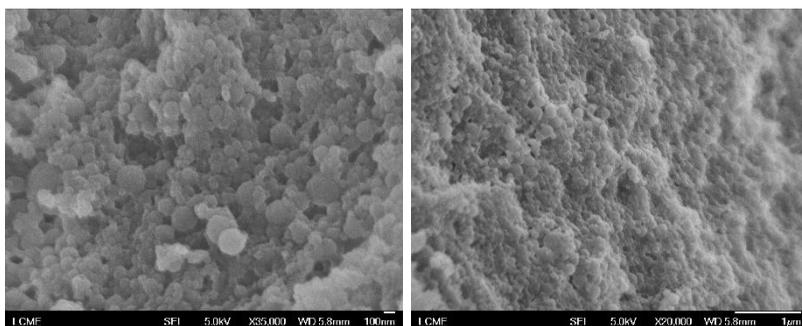
A adição de coestabilizador (Crodamol GTCC) à miniemulsão (reações M4 e M5) pode contribuir no processo de encapsulação. Avaliando as reações M3 e M4, um maior número de NPMs é

encapsulado para a concentração de 10% em massa de NPMs-AO quando utilizado Crodamol.

Lu e Forcada (2006) variaram o teor do coestabilizador hexadecano (Hd) de 3 a 12% nas formulações de miniemulsão para a encapsulação de Fe_3O_4 em poliestireno. Quando uma concentração de 12% de Hd foi utilizada, foram obtidos os melhores resultados de encapsulação, sem o aparecimento de partículas puras de polímero e NPMs sem revestimento polimérico (não encapsuladas). No entanto, quando o efeito da quantidade de NPMs foi avaliado, quanto maior a concentração testada (20%) maior a dificuldade de encapsulação, com aparecimento de partículas poliméricas puras e NPMs não encapsuladas. Desta forma, os melhores resultados de encapsulação obtidos pelos autores foram encontrados para uma concentração de material inorgânico de 10%.

As nanopartículas poliméricas magnéticas da reação M4, foram analisadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) e são apresentadas na Figura 31. A análise permitiu verificar a morfologia esférica com diâmetros entre 100 e 200 nm, corroborando com os resultados obtidos nas análises de MET e DLS (apresentadas a seguir).

Figura 31 - Micrografias de MEV-FEG das NPs magnéticas de PUU com 10% de Fe_3O_4 (reação M4) com barra de tamanhos de 100 nm (figura a esquerda) e 1000 nm (figura a direita).



O diâmetro médio em intensidade das gotas (D_g) e das partículas (D_p) e o índice de polidispersão (PdI) das reações apresentadas nas micrografias anteriores, foi medido por DLS. A Tabela 5 apresenta os resultados para as reações utilizando três concentrações diferentes de NPMs-AO encapsuladas em PUU.

A incorporação das NPMs-AO na fase orgânica aumentou o diâmetro das gotas formadas devido à maior viscosidade da fase dispersa. Este aumento de viscosidade observado visualmente, resultou em maior resistência à deformação e quebra das gotas na miniemulsificação, durante o processo de sonicação, obtendo desta forma gotas maiores.

Em todas as reações, o valor de D_g foi próximo do valor de D_p , o que indica que a polimerização ocorreu preferencialmente nas gotas e as mesmas mantiveram-se estáveis durante o curso da polimerização.

Tabela 5 - Diâmetros médios em intensidade das gotas (D_g) e das partículas (D_p) de PUU em diferentes concentrações de NPMs-AO e índice de polidispersão (PDI) medidos por DLS.

Amostra	D_g (nm)	PdI _g	D_p (nm)	PdI _p
PUU5% NPMs-AO	133,3±1,8	0,144	146,6±1,2	0,149
PUU10% NPMs-AO	172,0±0,1	0,208	177,0±0,8	0,209
PUU30% NPMs-AO	263,3±9,6	0,325	241,2±5,9	0,323

D_p e PDI foram afetados com a incorporação das NPMs-AO, aumentando o D_p em relação ao PUU puro (seção 3.3.2) de 100,5 nm para 146,6 nm (5% NPMs-AO/reação M1), 177,0 nm (10% NPMs-AO/reação M4) e 241,2 nm (30% NPMs-AO/reação M5), corroborando com os resultados de MET, que mostram o aumento do tamanho de partícula com o aumento da concentração de NPMs-AO. A mudança de cor do sistema, com o aumento do teor de NPMs-AO nas formulações pode ser visualizada na Figura 32.

Figura 32 - PUU com 5%, 10% e 30% em massa de NPMs-AO em relação ao IPDI.



O gráfico de distribuição de tamanho de partícula foi plotado para as reações M4 e M5 a partir da análise das imagens de MET no programa SizeMeter[®]. Os diâmetros médios em intensidade medidos por DLS foram maiores do que os diâmetros médios em massa determinados pela análise das imagens de MET, uma vez que a média em intensidade é mais afetada pela presença de partículas maiores do que a média em massa.

Conforme dados da Tabela 6, a reação M5, com 30% de NPMs-AO resultou no maior diâmetro médio numérico de partícula (D_{p_n} 184 nm) quando comparado com a reação M4 (10% NPMs-AO) com D_{p_n} de 115 nm.

Tabela 6 - Diâmetro médio de partícula numérico e em massa e PdI (obtidos por TEM) das reações M4 e M5.

Diâmetro médio	PUU_10% NPMs-AO (reação M4)	PUU_30% NPMs-AO (reação M5)
Numérico (nm)	115	184
Em massa (nm)	155	218
PdI	1,33	1,18

As distribuições de tamanho de partícula das reações M4 e M5 são apresentadas nas Figuras 33 e 34, e ambas são unimodais. No entanto, o maior número de partículas, na reação com 10% de NPMs em PUU (Figura 33) ficou na faixa entre 75 a 125 nm, enquanto que em PUU com 30% de NPMs-AO (Figura 34) a maioria das partículas ficou na faixa de 125 a 300 nm.

Figura 33 - Distribuição do tamanho de partícula, baseado nas micrografias de MET (reação M4) (*figura canto superior direito*).

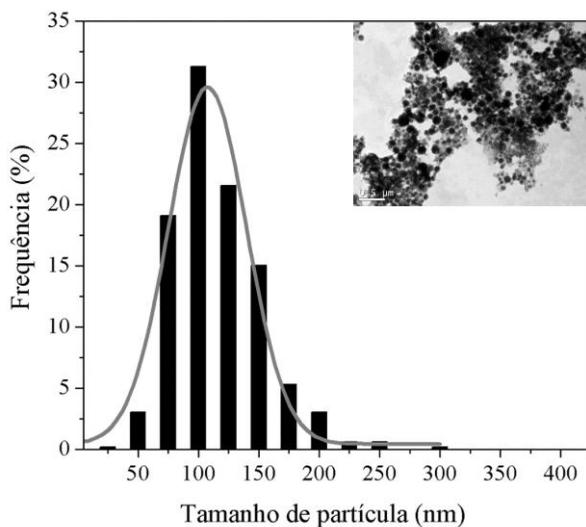
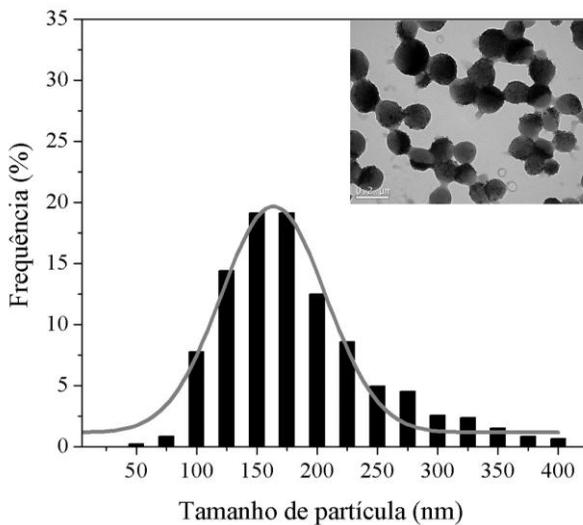


Figura 34 - Distribuição do tamanho de partícula, baseado nas micrografias de MET (reação M5) (*figura canto superior direito*).



3.3.3.4 Propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas das NPs poliméricas com Fe_3O_4 foram medidas por MAV e os resultados estão apresentadas em emu/g Fe_3O_4 . A magnetização de saturação (M_s) das NPs de PUU com 10% em massa de Fe_3O_4 é apresentada na Figura 35.

A redução de valor de M_s de 73,5 emu/g Fe_3O_4 (para NPMs-AO apresentadas na seção 3.3.1.4) para 35,66 emu/g Fe_3O_4 pode ser atribuída à densa camada de polímero não-magnético ao redor das NPMs-AO. Khoobi et al. (2015) observaram o mesmo comportamento de redução de M_s quando funcionalizaram a superfície de NPMs de Fe_3O_4 (M_s 46,4 emu/g) com polietilenoimina, (PEI), (M_s 33,8 emu/g), um polímero não magnético.

A redução também pode ser atribuída pelo fato de, durante a sonicação e a polimerização, parte da Fe_3O_4 ser convertida a outros tipos de óxidos de ferro sem magnetização, ou com baixa magnetização de saturação (M_s), como a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) ou a ferrita ($\alpha\text{-Fe}$), reduzindo o conteúdo de material superparamagnético (Fe_3O_4) (LANDFESTER e RAMIREZ, 2003; RAMÍREZ e LANDFESTER, 2003). No entanto, as NPs de PUU contendo 10% em massa de NPMs-AO apresentaram comportamento superparamagnético a temperatura ambiente, com a ausência de ciclo de histerese (Figura 35), baixa razão de perpendicularidade, M_r/M_s , ($5,04 \times 10^{-7}$) e baixos valores de coercitividade, H_c , (0,186 Oe), apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Propriedades magnéticas das NPs de PUU com 10% em massa (em relação ao IPDI) de NPMs-AO (reação M4)*.

Amostra	H_c (Oe)	M_r (emu/g Fe_3O_4)	M_s (emu/g Fe_3O_4)	M_r/M_s ($\times 10^{-7}$)
Reação M4	0,186	0,018	35,66	5,04

* NPMs-AO adicionadas antes da sonicação.

As propriedades superparamagnéticas das NPs de PUU contendo NPMs-AO são de grande relevância para diferentes tipos de aplicações que requerem que as NPs sejam dispersas em fase aquosa na ausência de um campo magnético externo. Isso implica que na ausência de um campo magnético externo, o valor total de magnetização é reduzido a zero, prevenindo a aglomeração das partículas. Quando um

campo magnético externo é aplicado, as NPs magnéticas de PUU são atraídas pelo ímã segregando-se da fase aquosa (Figura 36).

Figura 35 - Curva de magnetização das NPs de PUU com 10% de NPMs-AO (reação M4/NPMs-AO adicionadas antes da sonicção).

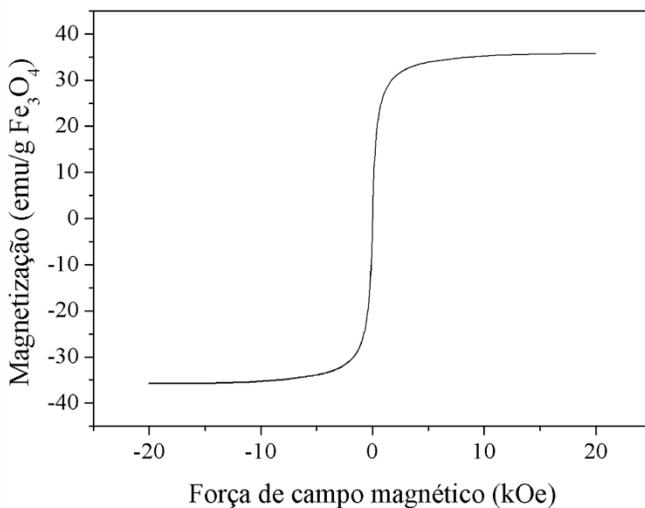
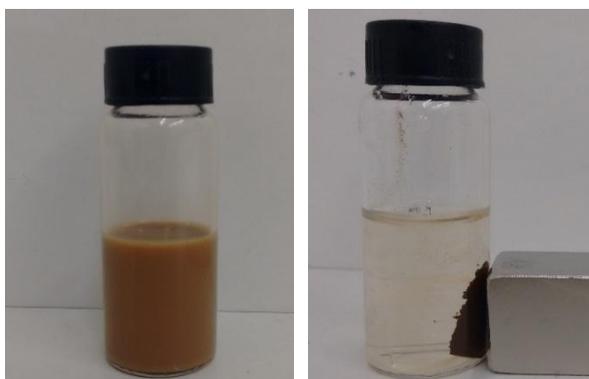


Figura 36 - PUU com 10% de NPMs-AO em água sem a aplicação de um campo magnético externo e com a aplicação de um campo magnético externo.



3.4 CONCLUSÕES

Nanopartículas de Fe_3O_4 com comportamento superparamagnético foram obtidas pelo método de co-precipitação. O recobrimento com ácido oleico (AO) formou uma superfície hidrofóbica nas NPs de Fe_3O_4 , permitindo a dispersão em monômero hidrofóbico (IPDI).

Nanopartículas magnéticas de poli (ureia-uretano), PUU, foram preparadas por polimerização interfacial em miniemulsão quando 1,6-hexanodiol foi utilizado como poliol e diisocianato de isoforona como diisocianato, e a incorporação de um grande número de NPs de Fe_3O_4 em PUU foi obtida.

Resultados de FTIR confirmaram a presença de Fe_3O_4 e PUU nas nanopartículas formadas. Em adição a isto, pelas análises de MET e DLS foi possível observar o aumento do diâmetro de partícula com o aumento do teor de NPMs-AO na fase dispersa.

Análises de TGA indicaram que as NPs de PUU com NPMs-AO continham até 34% em massa de Fe_3O_4 . De acordo com as análises de magnetização, as nanopartículas de PUU com NPMs-AO incorporadas apresentaram alta resposta magnética com M_s de 35,66 emu/g Fe_3O_4 e comportamento superparamagnético.

3.5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ao final do estudo da encapsulação de NPMs em NPs de poli(ureia-uretano) foi possível observar uma grande lacuna na literatura acerca da encapsulação de NPMs em polímeros obtidos por polimerização em etapas via miniemulsão, com isso, como sugestões para trabalhos futuros propõe-se :

1. Utilizar diferentes surfactantes/compostos para o recobrimento das NPMs;
2. Avaliar a proporção de poliuretano e de poliureia formados nas NPs de poli(ureia-uretano) sintetizadas;
3. Estudar a encapsulação de NPMs em poli(ureia-uretano) utilizando diferentes tipos de poliois;
4. Encapsulação de um fármaco no sistema de nanopartículas poliméricas magnéticas desenvolvido, avaliando os mecanismos envolvidos na degradação do polímero e liberação do fármaco.

CAPÍTULO IV

4. IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE B DE *Candida antarctica* EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE POLI (UREIA-URETANO)

4.1 INTRODUÇÃO

As lipases são a classe de enzimas mais utilizadas em reações químicas, entre elas acetilação, alcólise, acidólise, aminólise, interesterificação e resolução cinética de racematos (KOBAYASHI et al., 2001). A lipase CALB tem sido alvo de estudo para aplicações em diferentes tipos de indústrias, entre elas alimentícia, farmacêutica, têxtil, cosméticos, papel e oleoquímica. Estas possíveis aplicações devem-se às características particulares que incluem alta especificidade, alta atividade catalítica para reações brandas, resistência a solventes orgânicos, estabilidade térmica, amplas faixas de pH e alta estereo especificidade (DENG et al., 2011).

O crescente aumento na utilização de enzimas em nível acadêmico e industrial reflete a constante preocupação de pesquisadores em realizar um processo químico ambientalmente favorável, cada vez mais exigido pelos consumidores, em condições reacionais mais brandas e sem o uso de catalisadores químicos tóxicos utilizados em uma síntese química convencional (QIAO et al., 2015).

Desta forma, a biocatálise ganha destaque, uma vez que as enzimas são consideradas catalisadores “verdes”, além de todo o apelo ambiental, inúmeros outros fatores as tornam atrativas nas reações mediadas com seu uso, como sua elevada seletividade. Assim, a procura por biocatalisadores ideais e não danosos ao meio ambiente são motivos de inúmeras pesquisas (DENG et al., 2011; IDRIS e BUKHARI, 2012).

Porém, o uso das enzimas em sua forma livre pode acarretar em sua desnaturação frente a diferentes condições reacionais, além da dificuldade de sua recuperação para posterior reuso, uma vez que são solúveis nos meios reacionais. Para tais inconvenientes, a estratégia de imobilização de enzimas é uma alternativa que supre as dificuldades de seu uso em sua forma livre (GANDHI, 1997).

A imobilização de lipases em nanopartículas magnéticas foi proposta recentemente como um método atrativo para resolver os problemas anteriormente descritos. A retirada do catalisador do meio reacional é realizada com a aplicação de um campo magnético, além disto, materiais nanoestruturados promovem maior estabilidade no

processo de imobilização, pois fornecem uma maior área superficial, levando a uma maior concentração de enzima imobilizada por unidade de massa de partícula (TARTAJ et al., 2005).

Neste trabalho, lipase B de *Candida antarctica* foi imobilizada em NPMs superparamagnéticas de PUU por polimerização interfacial em miniemulsão e as partículas contendo enzima imobilizada foram aplicadas em reações de síntese de ésteres e caracterizadas por microscopia óptica de fluorescência e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

Em um segundo método de imobilização, lipase B de *Candida antarctica* foi imobilizada em NPMs de PUU em duas etapas, e a atividade relativa em relação à enzima livre foi medida em períodos de 30 minutos a 6 horas, assim como a estabilidade a diferentes temperaturas e pHs. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e microscopia eletrônica de varredura (MEV-FEG) foram utilizadas com a finalidade de avaliar a formação do derivado enzima-suporte.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Nesta seção serão descritos os reagentes e procedimentos experimentais utilizados, bem como as técnicas empregadas no processo de imobilização da lipase B de *Candida antarctica* utilizando as nanopartículas magnéticas de poli(ureia-uretano), (seção 3.3.3), como suporte.

4.2.1 Materiais

As nanopartículas de poli(ureia-uretano) foram preparadas utilizando diisocianato de isoforona (IPDI, 98%) e 1,6-hexanodiol como monômeros, ambos adquiridos da Sigma-Aldrich. Crodamol GTCC (Alfa Aesar) foi utilizado como coestabilizador. Dodecil sulfato de sódio (SDS, Vetec) foi utilizado como surfactante e ciclohexano (Sigma-Aldrich) como solvente para solubilizar o monômero IPDI.

Lipase B de *Candida antarctica* livre (Novozymes NZL-102, CALB), na forma líquida, foi cedida pela empresa Novozymes Latin América Ltda (Araucária, PR, Brasil). Ácido oleico (Vetec), álcool etílico (Dinâmica, P.A 99,5%), ácido propiônico (Vetec) e geraniol (Vetec, 97%) foram utilizados nas reações de esterificação e hidróxido de sódio (Quimex, P.A 97%) utilizado para a medida do índice de acidez.

Hidróxido de sódio (Quimex, P.A 97%), água destilada, ácido láurico (Dinâmica, P.A 98%), álcool n-propílico (Dinâmica, P.A 99,5%), acetona (Dinâmica, P.A 99,5%) e álcool etílico (Dinâmica, P.A 99,5%) foram utilizados para as medidas de atividade enzimática. Fosfato de sódio monobásico anidro (Vetec, P.A 99%), fosfato de sódio dibásico anidro (Vetec, P.A 99%) e água destilada foram utilizados para a preparação de tampão fosfato.

Para a estabilidade da enzima a diferentes pHs foram utilizados: tampão biftalato de potássio (pH $4\pm 0,05$), tampão fosfato (pH $7\pm 0,05$) e tampão ácido bórico (pH $10\pm 0,05$), adquiridos da Lafan. Todos os reagentes foram utilizados como recebidos, exceto a lipase CALB livre.

4.2.2 Métodos

4.2.2.1 Purificação da lipase B de *Candida antarctica*

A enzima cedida para os procedimentos experimentais encontrava-se dissolvida em sorbitol, desta forma, fez-se necessária uma purificação prévia. A purificação foi realizada por diálise da enzima em membrana celulósica utilizando tampão fosfato 0,05 M pH 7 durante 24 horas. Após a purificação, as soluções enzimáticas dialisadas foram dispostas em camadas de um centímetro de espessura em placas de Petri e submetidas a congelamento a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por no mínimo 24 horas. Após este período, as amostras foram liofilizadas por 24 horas, e pelo processo de sublimação em condições de vácuo a água livre presente no congelado foi removida.

4.2.2.2 Imobilização da lipase CALB em NPs magnéticas de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão em uma etapa

NPs de PUU com Fe_3O_4 foram sintetizadas conforme descrito na seção 3.2.2.3. A fase dispersa (orgânica) foi preparada utilizando o monômero IPDI como diisocianato, ciclohexano, NPMs-AO e Crodamol GTCC. A fase contínua (aquosa) foi preparada utilizando 1,6-hexanodiol como polioliol, água, SDS e enzima livre em diferentes concentrações. A razão molar diisocianato:polioliol (NCO:OH) utilizada foi de 2,5:1. As formulações utilizadas nas polimerizações em miniemulsão são representadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Formulações utilizadas nas reações de miniemulsão. *

Reagentes e condições	I1	I2
IPDI (g)	2,46	2,46
1,6-hexanodiol (g)	0,53	0,53
Ciclohexano (mL)	2,5	2,5
SDS (g)	0,3	0,3
Crodamol (g)	0,54	0,54
NPMs-AO (g)	0,25 ^a	0,25 ^a
Enzima (g)	0,07 ^b	0,35 ^c

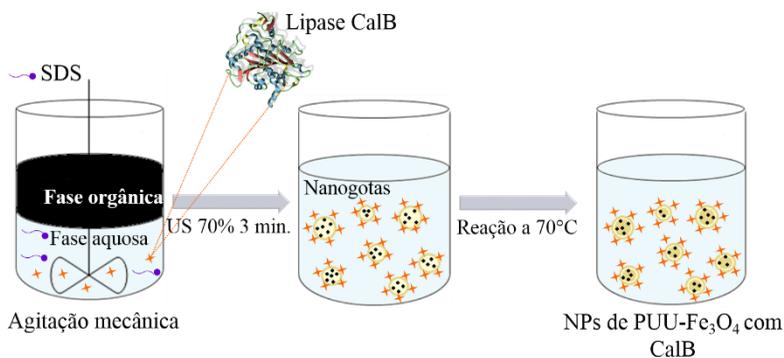
*miniemulsões foram preparadas com 10 mL de água;

^a 10% em massa em relação ao IPDI;

^b 2% e ^c 10% em massa em relação aos monômeros (IPDI, 1,6-hexanodiol) e Crodamol.

O método de preparo já descrito anteriormente na seção 3.2.2.3 foi realizado utilizando NPMs-AO dispersas diretamente na fase orgânica junto com IPDI, Crodamol e ciclohexano. Na fase aquosa, concentrações de 2 e 10% de enzima em relação aos monômeros foram avaliadas. As condições de sonicação, regime de pulso, tempo e temperatura de polimerização permaneceram as mesmas mencionadas no item 3.2.2.3. A Figura 37 representa esquematicamente o preparo das miniemulsões.

Figura 37 - Representação esquemática da imobilização da lipase CALB em NPs magnéticas de PUU.



Fonte: Autor (2015).

4.2.2.3 Imobilização da lipase CALB em NPs magnéticas de PUU em duas etapas

NPs de PUU com Fe_3O_4 foram sintetizadas conforme descrito na seção 3.2.2.3 para as melhores condições de encapsulação, a fim de avaliar a influência das três diferentes concentrações de magnetita no processo de imobilização. Como a utilização de Crodamol levou à obtenção de melhores resultados, conforme reportado na seção 3.3.3.3, foi adicionado (17% em massa de Crodamol em relação à fase orgânica) à formulação com 5% em massa de NPMs, que não havia sido testado anteriormente.

A razão molar diisocianato:poliol (NCO:OH) utilizada foi de 2,5:1. As formulações utilizadas nas polimerizações em miniemulsão estão representadas na Tabela 1, seção 3.2.2.3, assim como o método de preparo.

Após a obtenção das NPMs de PUU, o látex obtido foi disposto em camadas de um centímetro de espessura em placas de Petri e submetidas a congelamento a $-80\text{ }^\circ\text{C}$ por no mínimo 24 horas. Após este período, as amostras foram liofilizadas por cerca de 24 horas, para remoção de água livre por sublimação.

Após a obtenção das NPMs de PUU liofilizadas, o processo de imobilização (Figura 38) foi realizado pelo contato das NPMs de PUU com 20 mL de solução tampão de fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,6. O sistema foi mantido sob agitação de 150 rpm em shaker (Dist) a $30\text{ }^\circ\text{C}$. O tempo de contato enzima-suporte foi avaliado em um período entre 30 minutos a 6 horas. Diferentes concentrações de enzima e NPMs-AO (no suporte) foram testadas no processo de imobilização e as formulações utilizadas podem ser visualizadas na Tabela 9.

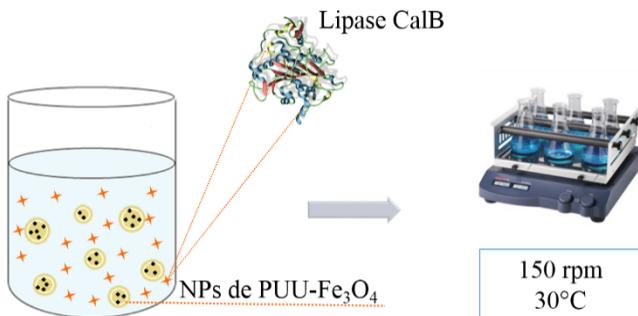
Tabela 9 - Condições de imobilização das NPMs de PUU e lipase CALB.

Reagentes e condições	A1	A2	A3	A4	A5	A6
NPMs-PUU (g)	0,6 ^a	0,6 ^b	0,6 ^c	0,6 ^a	0,6 ^b	0,6 ^c
Enzima (g)	0,011 ^c	0,011 ^c	0,011 ^c	0,04 ^d	0,04 ^d	0,04 ^d

PUU com ^a5, ^b10 e ^c30% em massa de magnetita;

[°]0,55 e ^d2 mg de enzima/mL de tampão fosfato.

Figura 38 - Processo de imobilização da lipase CALB em NPMs-AO.

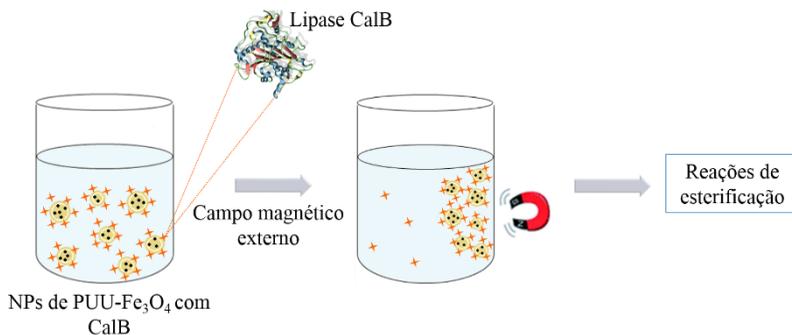


Fonte: Autor (2015).

4.2.2.4 Aplicação da lipase CALB imobilizada em NPMs de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão em uma etapa

A fração do látex, sintetizado via polimerização interfacial em miniemulsão (com processo de imobilização em uma única etapa) atraída por um campo magnético externo foi removida e utilizada como catalisador nas reações de esterificação de três sistemas reacionais diferentes (Figura 39).

Figura 39 - Representação esquemática da remoção das lipases imobilizadas em NPMs-AO para aplicação em reações de esterificação.



Fonte: Autor (2015).

Para a produção de etil oleato, adaptada de Bernardes e colaboradores (2007), em sistema livre de solvente orgânico, 7% (m/m) do látex atraído por um campo magnético externo (contendo enzima imobilizada em NPMs magnéticas de PUU) foi utilizado, e adicionado etanol e ácido oleico ao sistema reacional na razão molar (1:3), em erlenmeyers de 250 mL, fechados com tampa de vidro. Estes foram incubados em shaker a 150 rpm a temperatura de 50 °C por 4 horas. Dois sistemas reacionais diferentes foram testados, um com adição total de etanol ao sistema reacional e o outro com adição gradual de etanol (três adições consecutivas) em tempos de 0, 30 minutos e 1 hora de reação.

Para a produção de geranyl oleato e geranyl propionato, a esterificação foi conduzida segundo dados otimizados por Paroul e colaboradores (2010 e 2011). A concentração do látex atraído por um campo magnético (contendo enzima imobilizada em NPMs magnéticas de PUU) de 10% (m/m) foi utilizada. Para a produção de geranyl oleato, geraniol e ácido oleico foram utilizados como substratos, enquanto que para a produção de geranyl propionato, geraniol e ácido propiônico foram utilizados, ambos em razões molares (álcool:ácido) de 1:3. Os reagentes foram pesados em erlenmeyers de 250 mL e fechados com tampa de vidro. Os mesmos foram incubados em shaker a 150 rpm a temperatura de 40 °C por 6 horas.

Para todos os sistemas, o volume médio reacional utilizado foi de 5 mL. Após o término das reações, a enzima imobilizada no suporte foi separada magneticamente do meio reacional e este, contendo éster, ácidos graxos livres e água, foi analisado pelo método de titulação, que vem a substituir a cromatografia gasosa na quantificação de ácidos graxos (CHEN et al., 2012; ZHANG et al., 2012).

A titulação consiste basicamente em determinar a acidez do meio reacional, pelo consumo dos ácidos graxos restantes na reação com o NaOH. O procedimento foi realizado pela retirada de uma alíquota de 500 µL do meio reacional e adicionados 15 mL de acetona:etanol (1:1) para cessar a reação de esterificação. A titulação foi conduzida até pH 11 (pHmetro Analion 2000), com a utilização de NaOH 0,05 M. O índice de acidez foi calculado pela Equação 6. Todas as titulações foram realizadas em triplicata e o desvio padrão entre medidas foi calculado e apresentado nos resultados e discussão.

$$A = \frac{39,997 * V * M}{ma} \quad (6)$$

Sendo:

A = índice de acidez (mg NaOH/g);

39,997 = equivalente grama do NaOH;

V = volume de NaOH gasto na titulação (mL);

M = molaridade do NaOH usada na titulação;

ma = massa de amostra utilizada para titular.

Para determinar o percentual de conversão de ácido graxo livre é necessário determinar a acidez do sistema reacional. Determinando a acidez dos sistemas reacionais (geraniol:ácido oleico, geraniol:ácido propiônico e etanol:ácido oleico) no tempo 0 e após a reação nas condições descritas anteriormente, é possível determinar a conversão de ácidos graxos, diretamente relacionada com o teor de ésteres da mistura. O cálculo para a conversão dos ácidos graxos é apresentado na Equação 7.

$$X_{AGL} (\%) = \left(\frac{A_0 - A_f}{A_0} \right) * 100 \quad (7)$$

Sendo:

X_{AGL} = conversão de ácido graxo livre;

A_0 = índice de acidez inicial;

A_f = índice de acidez final.

A acidez foi calculada assim que as amostras foram retiradas do shaker, evitando assim a evaporação dos componentes.

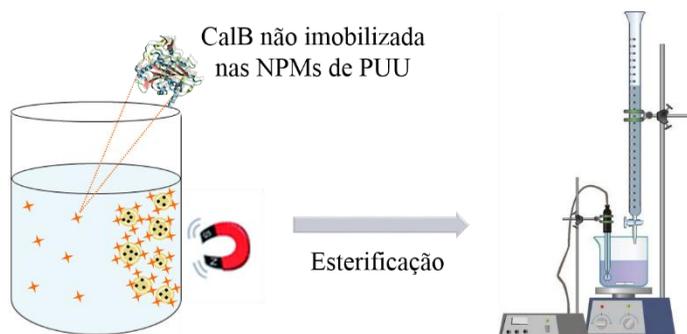
4.2.2.5 Determinação da atividade enzimática da lipase CALB imobilizada em NPs de PUU com Fe_3O_4 em duas etapas

Para a imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU em duas etapas, após a incubação em shaker um campo magnético externo foi aplicado na solução contendo enzima, tampão fosfato e NPMs- Fe_3O_4 (Figura 40). A atividade do sobrenadante (não atraído pelo ímã) foi quantificada através do consumo de ácido láurico na esterificação entre o ácido láurico e o propanol com razão molar ácido-álcool 3:1 à

temperatura de 60 °C, sob agitação a 450 rpm por 40 minutos, adaptada de Oliveira e colaboradores (2006).

Para as medidas de atividade da enzima livre 5% (m/m) do extrato enzimático foi pesado e para as medidas da enzima imobilizada, 5% (m/m) do sobrenadante não atraído pelo ímã (contendo solução tampão fosfato e enzima não imobilizada) foi pesado, ambos adicionados ao sistema reacional contendo ácido láurico e propanol.

Figura 40 - Medida de atividade da lipase CALB em PUU-NPMs.



Fonte: Autor (2015).

A reação foi iniciada pela adição do sobrenadante (para enzima imobilizada) ou extrato enzimático (enzima livre) ao meio reacional, em um reator de vidro aberto, de 20 mL, provido de agitação magnética e conectado a um banho termostático (MQBTC Micro Química). Alíquotas de 150 μ L, em triplicata, foram retiradas do meio reacional no tempo zero e após 40 minutos de reação e foram diluídas em 20 mL de acetona-etanol (1:1) com a finalidade de cessar a reação e extração dos ácidos restantes. A quantidade de ácido láurico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,01 M até pH 11. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 μ mol de ácido láurico por minuto nas condições experimentais descritas. Todas as determinações de atividade enzimática foram realizadas em triplicata e o desvio padrão entre medidas foi calculado e apresentado nos resultados e discussão. A atividade de esterificação foi calculada pela Equação 8.

$$\text{Atividade (U/g)} = \frac{(V_0 - V_{40})}{t * m_a} * M * 10^3 \quad (8)$$

Sendo:

M = molaridade da solução de NaOH;

V_0 = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada no tempo zero (mL);

V_{40} = volume de NaOH gasto na titulação da amostra retirada após 40 minutos de reação (mL);

ma = massa de preparação enzimática (sobrenadante) utilizada na reação (g);

t = tempo de reação (min);

1U = 1 μ mol de ácido/min.

Após a medida da atividade da enzima imobilizada em NPMs de PUU, controlando a atividade inicial e final de CALB no sobrenadante da imobilização, a atividade relativa do derivado foi calculada em relação a atividade da enzima livre, segundo a Equação 9.

$$AR (\%) = 100 - \left(\left(\frac{A \text{ (U/g) enzima imobilizada}}{A \text{ (U/g) enzima livre}} \right) * 100 \right) \quad (9)$$

4.2.3 Caracterização do derivado enzimático

4.2.3.1 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada utilizando um espectrômetro IR Prestige-21 da marca Shimadzu, alocado no Laboratório de Controle de Processos e Polimerização (LCP) da UFSC. A análise foi realizada com a finalidade de verificar a interação da enzima no derivado polimérico magnético. Para as amostras contendo enzima imobilizada, o derivado foi atraído magneticamente por um campo magnético externo após a imobilização e seco em estufa a 60°C. As amostras foram compactadas com brometo de potássio (KBr) e analisadas com resolução de 4 cm^{-1} , com 32 varreduras em um intervalo de 4000-400 cm^{-1} .

4.2.3.2 Morfologia da lipase CALB imobilizada em NPMs de PUU e tamanho de partícula

A morfologia da lipase imobilizada CALB em duas etapas foi determinada utilizando microscópio óptico de fluorescência (módulo

deconvolução, Leica DM5500) com filtros UV, azul e verde, alocado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. A fração magnética dos látices (contendo corante 6-Coumarin), atraída por um campo magnético externo, foi diluída em água destilada (1:10) e gotejada em uma lâmina de vidro a temperatura ambiente.

Para a imobilização conduzida em uma única etapa, o diâmetro médio (em intensidade) das gotas de monômero (Dg) e das partículas de polímero (Dp) e o índice de polidispersão (PdI) foram determinados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering-DLS) utilizando o equipamento Zetasizer Nano S ZEN1600 (ângulo do feixe incidente de 173° e comprimento de onda do laser de 633 nm), da Malvern Instruments, alocado no Laboratório de Controle e Processos e Polimerização (LCP) da UFSC. As leituras foram feitas pela diluição do látex em água destilada (1:10) e os valores finais foram expressos pela média de duas medidas.

4.2.3.3 Estabilidade da enzima imobilizada ao armazenamento

A imobilização de *Candida antarctica* em NPMs de PUU (em duas etapas) foi avaliada frente ao armazenamento da enzima imobilizada, nas condições de 10 % de NPMs-AO no suporte liofilizado e 2 mg/mL de enzima em tampão fosfato. A amostra foi armazenada a 4 °C e a atividade relativa foi medida a cada dois dias de armazenamento, conforme descrito no item 4.2.2.5.

4.2.3.4 Estabilidade ao pH

A estabilidade das lipases ao pH foi avaliada pela incubação da enzima (livre e imobilizada em duas etapas) em soluções tampão pH 4, 7 e 10 por 6 horas a 30 °C em shaker com agitação de 150 rpm. No estudo da estabilidade da enzima imobilizada, as condições de imobilização utilizadas foram de 10% de NPMs-AO no suporte liofilizado e 2 mg/mL de enzima em tampão com diferentes faixas de pH (4, 7 e 10). A atividade relativa (%) foi medida conforme descrito no item 4.2.2.5.

4.2.3.5 Estabilidade à temperatura

A estabilidade térmica das lipases a diferentes temperaturas foi avaliada pela incubação da enzima (livre e imobilizada em duas etapas) em shaker com agitação de 150 rpm em uma faixa de temperatura de 40

a 80 °C. No estudo da estabilidade da enzima imobilizada, as condições de imobilização utilizadas foram de 10% NPMs-AO no suporte liofilizado e 2 mg/mL de enzima em tampão pH 7,6 com diferentes faixas de temperatura (40, 60 e 80 °C). A atividade relativa do derivado (%) foi medida conforme descrito no item 4.2.2.5.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Imobilização de lipase CALB em NPMs de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão

Após a obtenção da lipase CALB imobilizada na superfície das NPMs de PUU via polimerização interfacial em miniemulsão, o derivado magnético atraído por um campo externo foi analisado em microscópio óptico de fluorescência e os diâmetros de partícula foram medidos por DLS. Após a constatação da presença da lipase CALB na superfície das partículas poliméricas magnéticas, o derivado magnético foi aplicado como catalisador em reações de síntese orgânica para produção de ésteres aromáticos (geranil oleato e geranil propionato) e éster de etil oleato.

4.3.1.1 Morfologia das NPMs de PUU com lipase CALB imobilizada

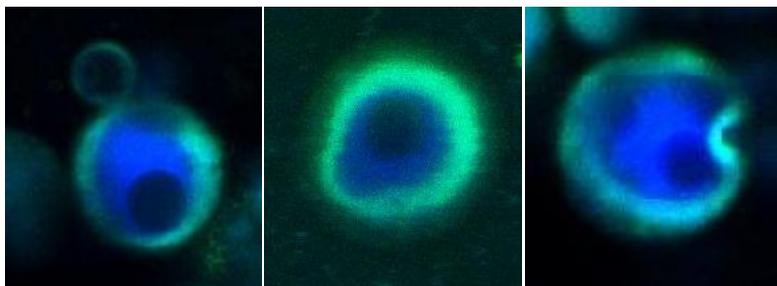
As imagens de microscopia óptica de fluorescência para as frações de látex atraídas por um campo magnético externo são apresentadas na Figura 41.

A partir da Figura 41 é possível confirmar a ligação enzima-NPMs de PUU, através da presença da lipase (coloração verde) na superfície das NPs sintetizadas. Esta ligação é proveniente do grupamento amida na superfície da lipase e do grupamento NCO oriundo do IPDI, uma vez que a ligação de formação de PUU ocorre na interface óleo/água parte do IPDI presente nas gotas pode reagir com o grupamento amida da enzima (solúvel na fase aquosa) (CIPOLATTI et al., 2014).

Cípolatti e colaboradores (2014) imobilizaram a lipase CALB em NPs peguilladas de PUU via polimerização em miniemulsão e observaram a morfologia da lipase-polímero pela técnica de microscopia óptica de fluorescência. A partir da análise da enzima em sua forma livre, observaram a fluorescência da CALB na cor verde e do polímero formado em coloração mais escura. Desta forma, as nanopartículas de PUU finais contendo lipase, apresentaram núcleo de coloração mais

escura e extremidades das NPs com coloração verde, confirmando a ligação enzima-polímero na superfície das NPs sintetizadas.

Figura 41 - Morfologia das nanopartículas magnéticas de PUU com lipase CALB após polimerização interfacial em miniemulsão.



O diâmetro médio em intensidade das gotas (D_g) e das partículas (D_p) e o índice de polidispersão (PdI) das reações I1 e I2 foi medido por DLS. Com a análise da Tabela 10 é possível observar que o D_g e o D_p mantiveram-se estáveis, indicando que a polimerização ocorreu preferencialmente nas gotas, estáveis durante a polimerização.

Tabela 10 - Diâmetros médios em intensidade das gotas (D_g), diâmetros médios em intensidade das nanopartículas (D_p) magnéticas de PUU com CALB imobilizada e índice de polidispersão (PdI) medidos por DLS.

Amostra	D_g (nm)	PdI_g	D_p (nm)	PdI_p
PUU-10%NPM-2%E	198,2±0,7	0,190	203,2±1,2	0,201
PUU-10%NPM-10%E	218,6±0,4	0,201	225,8±0,7	0,230

Com a adição da enzima ao processo de miniemulsificação, os diâmetros aumentaram em relação ao diâmetro de PUU com 10% de NPMs-AO (D_p 177 nm, seção 3.3.3.3) aumentando para 203 e 225 nm quando utilizadas concentrações de 2 e 10% de enzima em relação aos monômeros, respectivamente. Este aumento está associado à presença da lipase na superfície das NPs poliméricas magnéticas.

4.3.1.2 Aplicação da lipase imobilizada em reações de síntese orgânica

Com o intuito de explorar o potencial catalítico da lipase CALB imobilizada nas NPs magnéticas de poli(ureia-uretano), reações de esterificação em diferentes sistemas foram realizadas e os resultados são apresentados nas Tabelas 11 a 14. As maiores conversões em etil oleato (Tabela 11) foram obtidas quando o látex total, após a polimerização interfacial em miniemulsão, (sem separação magnética) foi utilizado, atingindo conversão de 98,2%.

Tabela 11 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de etil oleato a 50° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 4 horas reacionais.

Suporte	% AGL	% conversão em éster
PUU-10%NPM-2%E	15,0	85
PUU-10%NPM-10%E	13,7	86,3
PUU-10%NPM-2%E*	1,8	98,2

*reações realizadas com o látex total após a imobilização via polimerização em miniemulsão interfacial.

De Souza (2013) estudou a imobilização da lipase de *Candida antarctica* em nanopartículas de Fe₃O₄ modificadas com γ -aminopropiltriétoxissilano (APTS) e glutaraldeído, e observou o comportamento da lipase imobilizada na aplicação em reações de síntese de etil oleato atingindo conversões de 90% em 48 horas de reação.

Bernardes e colaboradores (2007) obtiveram baixas conversões em etil oleato quando a adição de etanol foi realizada em uma única etapa (16,9% em 8 horas). Para isto, a adição gradual foi realizada a fim de evitar a desativação da lipase por uma concentração elevada de álcool no início do sistema reacional.

Desta forma, os suportes utilizados na imobilização da CALB foram testados em reações de produção de etil oleato com adição de etanol em três etapas, e os resultados são apresentados na Tabela 12. As conversões obtidas foram superiores as descritas anteriormente, com adição única de etanol.

Tabela 12 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de etil oleato com substrato adicionado em etapas a 50° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 4 horas reacionais.

Suporte	% AGL	% conversão em éster
PUU-10%NPM-2%E	2,6	97,4
PUU-10%NPM-10%E	5,6	94,4
PUU-10%NPM-2%E*	0,4	99,6

*reações realizadas com o látex total após a imobilização via polimerização em miniemulsão interfacial.

Na produção de geranil oleato, conversões de 100% foram obtidas em todas as faixas estudadas (Tabela 13). Dados semelhantes são descritos por Paroul e colaboradores (2011), cujo trabalho foi realizado em temperatura de 50 °C, razão molar geraniol:ácido oleico 3:1 e 5,5 % (m/m) de lipase comercial Novozym 435, obtendo uma conversão de 98,71% em éster.

Tabela 13 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de geranil oleato a 40° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 6 horas reacionais.

Suporte	% AGL	% conversão em éster
PUU-10%NPM-2%E	0	100
PUU-10%NPM-10%E	0	100
PUU-10%NPM-2%E*	0	100

*reações realizadas com o látex total após a imobilização via polimerização em miniemulsão interfacial.

Na síntese de geranil propionato 100% de conversão foi obtida (Tabela 14) para reações com látex total e em reações com o derivado atraído pelo campo magnético. Paroul e colaboradores (2010) obtiveram conversões acima de 95% quando utilizado 10% (m/m) da lipase comercial de *Candida antarctica* (Novozym 435) a 40 °C em razão molar álcool:ácido de 3:1.

Tabela 14 - Percentual em ácidos graxos livres e conversões em ésteres na síntese de geranyl propionato a 40° C, 150 rpm, RM álcool:ácido 1:3 em 6 horas reacionais.

Suporte	% AGL	% conversão em éster
PUU-10%NPM-2%E	12,8	87,2
PUU-10%NPM-10%E	0	100
PUU-10%NPM-2%E*	0,7	99,3

*reações realizadas com o látex total após a imobilização via polimerização em miniemulsão interfacial.

As altas conversões obtidas quando o látex total foi utilizado como catalisador nas reações de esterificação podem ser atribuídas a enzima adsorvida nas partículas de PUU puro. Estas por sua vez não são atraídas pelo campo magnético, resultando (em determinados casos) em menores conversões quando o derivado magnético (atraído pelo campo magnético externo) foi utilizado como catalisador, uma vez que a massa total de enzima é reduzida. Como discutido anteriormente no item 3.3.3.1, para uma concentração de 10% de NPMs-AO no suporte, cerca de 17% do polímero total possui NPM-AO encapsulada.

Em geral, as condições de imobilização utilizadas para as reações de esterificação conduziram a altas conversões em todos os sistemas reacionais testados. A utilização de enzimas em reações desta natureza vem a suprir inconvenientes que podem ser encontrados em uma rota química convencional com a utilização de um catalisador ácido, por exemplo.

O método de imobilização mostrou-se eficaz, com relevante aplicação na área de síntese orgânica e produção de ésteres aromáticos. Além de ser um processo inovador, uma vez que a técnica de imobilização em uma única etapa via polimerização interfacial em miniemulsão nunca foi reportada anteriormente na literatura para nanopartículas magnéticas encapsuladas em matriz polimérica de poli(ureia-uretano).

4.3.2 Imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU em duas etapas

A imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU via mecanismo em duas etapas pode ocorrer por dois métodos diferentes: ligação covalente e/ou adsorção física.

O primeiro método pode ocorrer pela ligação covalente entre o grupamento amida, na superfície da lipase, com o grupamento NCO residual do suporte (não consumido durante a encapsulação). Como apresentado no item 3.3.3.2, na análise de FTIR das NPs magnéticas de PUU, o diisocianato não foi detectado após a polimerização interfacial em miniemulsão, desta forma, mesmo que presente, a concentração de NCO é baixa, reduzindo a possibilidade de ligação entre o NCO e a superfície da enzima.

O segundo método ocorre pela adsorção física entre o suporte e a lipase durante o contato em solução tampão. O principal problema na adsorção é a liberação da enzima ligada ao suporte, devido à fraca interação entre os materiais, já a força de ligação entre o suporte e a enzima ancorada covalentemente evita a dessorção catalisador-suporte durante e após o processo de imobilização. Apesar da imobilização não-covalente apresentar este inconveniente, a atividade da enzima permanece praticamente inalterada após o processo de imobilização e um dos principais fatores que determinam a estabilidade da enzima no suporte é a interação eletrostática (KHOABI et al., 2015).

Em um primeiro momento, foi avaliado se as NPMs de PUU liofilizadas poderiam interferir no pH do sistema de imobilização em tampão fosfato 0,1M, uma vez que as NPMs encapsuladas possuem recobrimento com ácido oleico. Para isso, o suporte liofilizado foi incubado em shaker nas condições de temperatura e agitação propostas para o processo de imobilização e o pH do meio foi monitorado. Durante as 6 horas de incubação, o pH se manteve estável na faixa entre 7,5 e 7,6.

4.3.2.1 Estudo da influência de material magnético no suporte e concentração de enzima

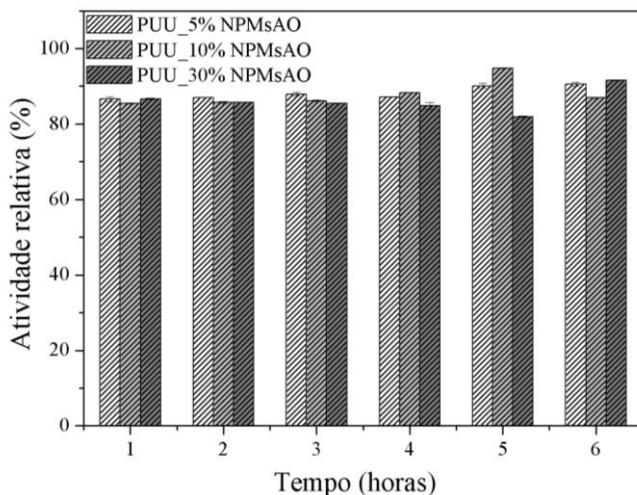
A lipase CALB foi imobilizada pelo processo em duas etapas pelo contato das nanopartículas poliméricas magnéticas liofilizadas e a enzima em solução tampão fosfato 0,1M. Com o objetivo de avaliar a interferência do material magnético encapsulado no suporte em relação a atividade da enzima livre (18,7 U/g), as três concentrações de magnetita utilizadas na encapsulação em PUU (item 3.3.3.3) foram avaliadas.

A Figura 42 apresenta os resultados de imobilização em um período de incubação em shaker de 6 horas a 30 °C com uma concentração de enzima de 0,55 mg/mL. As barras de erro estão apresentadas, porém o desvio padrão calculado não ultrapassou 2% em

todas as titulações realizadas. Como observado, com tempo mínimo de 1 hora, a lipase imobilizada nas nanopartículas poliméricas magnéticas apresentou 86,6; 85,5 e 86,7% na atividade relativa em relação à enzima livre para concentrações de 5, 10 e 30% em massa de magnetita no suporte (condições A1, A2 e A3), respectivamente.

O procedimento de imobilização levou a maiores atividades relativas com o decorrer do tempo e/ou manteve-se estável em todas as concentrações de Fe_3O_4 utilizadas no suporte, atingindo atividade relativa (em relação à atividade da enzima livre) de 90,5; 87 e 91% em tempo de 6 horas para as concentrações 5, 10 e 30% de Fe_3O_4 .

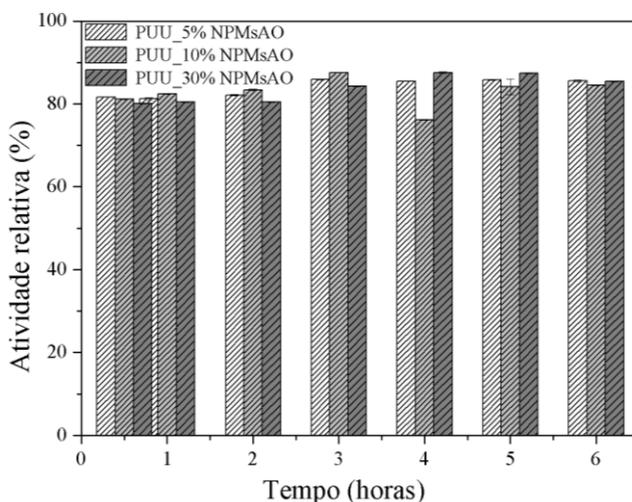
Figura 42 - Tempo de imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU com diferentes concentrações de Fe_3O_4 e 0,55 mg/mL de enzima em solução tampão fosfato.



Como em uma hora de imobilização a lipase imobilizada apresentou elevada atividade, para a concentração de 2 mg/mL de enzima, nas mesmas condições de suporte testadas acima, a atividade relativa foi medida após 30 minutos e foi acompanhada até 6 horas de contato. A Figura 43 apresenta os resultados de imobilização durante 6 horas de incubação em shaker a 30 °C com concentração de enzima de 2 mg/mL (condições A4, A5 e A6). As barras de erro estão apresentadas, porém o desvio padrão calculado não ultrapassou 2% em todas as titulações realizadas.

Como observado, com tempo mínimo de 30 minutos, a lipase imobilizada apresentou 81,6; 81,2 e 80% de atividade relativa em relação à enzima livre para concentrações de 5, 10 e 30% em massa de magnetita, respectivamente, demonstrando a rápida adsorção entre a lipase e o suporte logo no início do processo de imobilização. Com o decorrer das medidas relativas, a atividade aumentou ou manteve-se estável em todas as concentrações de Fe_3O_4 utilizadas no suporte, atingindo atividade relativa de 85,6; 84,5 e 85,4% em 6 horas para as concentrações iniciais teóricas de 5, 10 e 30% de Fe_3O_4 em relação ao IPDI.

Figura 43 - Tempo de imobilização da lipase CALB em NPMs de PUU com diferentes concentrações de Fe_3O_4 e 2 mg/mL de enzima em solução tampão fosfato.



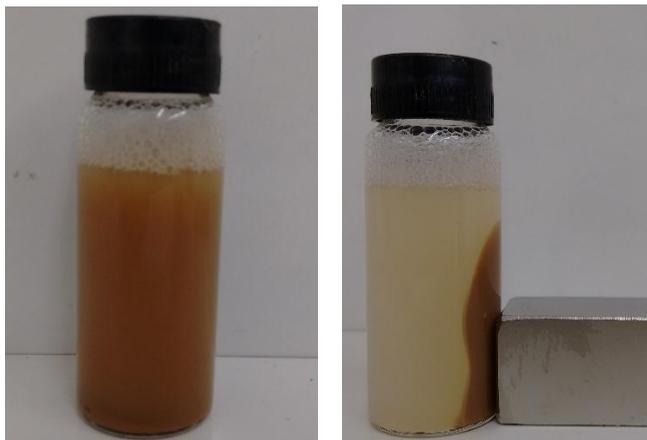
O aumento da concentração de enzima não levou ao aumento da atividade relativa no processo de imobilização, uma vez que elevando a concentração da lipase os valores de atividade relativa permaneceram na mesma faixa, ou até em faixas inferiores. Este fato indica que a superfície do suporte (nanopartículas poliméricas magnéticas) pode estar saturada com enzima adsorvida, desta forma, o aumento da quantidade de catalisador no processo não conduz a valores mais elevados de atividade. A adsorção da CALB sobre o suporte ocorre primeiramente na superfície disponível, e após a superfície estar coberta, ocorrem a formação de agregados de enzima. A agregação de proteínas é possível

em solução aquosa, e os agregados formados podem ser adsorvidos à superfície (MILETIĆ et al., 2010).

A Figura 44 ilustra a separação do material magnético, com enzima imobilizada, da solução tampão fosfato não atraída pelo campo magnético externo. Como é possível observar na Figura 44, o suporte contendo NPs poliméricas magnéticas e lipase é totalmente atraído pelo campo magnético externo, o que indica que o suporte contendo enzima mantém suas propriedades superparamagnéticas após o processo de imobilização.

Bussamara e colaboradores (2013) imobilizaram lipase de *Pseudomonas cepacia* pela deposição de NPs magnéticas de níquel (Ni) na superfície do catalisador, sem nenhum recobrimento do material inorgânico ou modificação de sua superfície. Apesar da simplicidade do método e altas retenções de atividade em relação à enzima livre, a ausência de um estabilizante nas NPs de Ni pode acarretar em aglomeração das NPs em solução aquosa, resultando em excesso de Ni livre aglomerado, podendo causar inconvenientes no processo de imobilização.

Figura 44 - Lipase CALB imobilizada em NPMs de PUU em solução tampão fosfato sem a aplicação de um campo magnético externo e com a aplicação de um campo magnético externo.



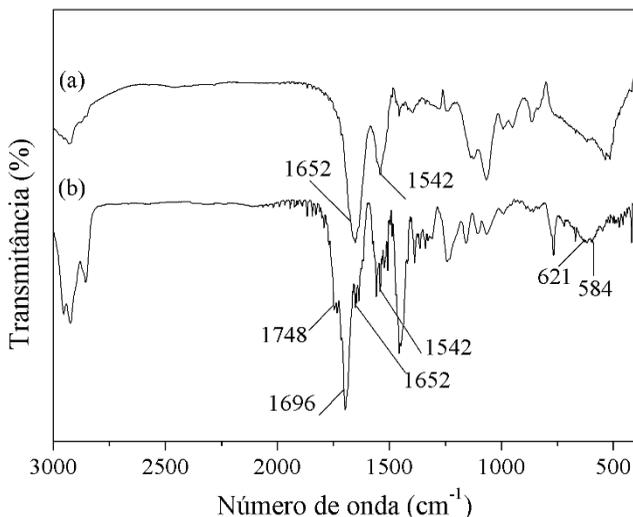
4.3.2.2 Caracterização da enzima imobilizada por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier foi utilizada para análise da lipase CALB livre e da lipase imobilizada em duas etapas com concentração de enzima (em relação ao tampão fosfato) de 2 mg de enzima/mL em suporte de NPs de PUU com relação teórica inicial de 10% de Fe_3O_4 em relação ao IPDI.

O espectro de FTIR (Figura 45) confirma a formação de poli (ureia-uretano) no suporte, sintetizado previamente ao procedimento de imobilização, pelas bandas de absorção com picos localizados em 1748 cm^{-1} (grupo uretano, C=O) e 1696 cm^{-1} (grupo ureia, N-H).

A ausência de banda de absorção localizada em 2270 cm^{-1} , correspondente ao grupo isocianato (N=C=O), confirma o consumo total do diisocianato durante a reação de polimerização. As bandas de absorção localizadas em 621 e 584 cm^{-1} correspondem a vibrações características de ligações Fe-O das NPs de Fe_3O_4 , e podem ser vistas no espectro das NPs magnéticas de PUU com 2 mg/mL de enzima imobilizada.

Figura 45 - Espectro de FTIR da (a) CALB livre e (b) 2 mg/mL de CALB imobilizada em NPs de PUU com 10% de NPMs-AO em massa (em relação ao IPDI).



O espectro da lipase CALB livre mostra um espectro típico de proteínas com bandas de absorção associadas ao grupo amida (CONH) primário e grupo amida secundário em 1652 e 1542 cm^{-1} (BARTH, 2007; FORESTI et al., 2010). Após a imobilização, estes grupos permaneceram no espectro da lipase imobilizada, o que indica a presença de enzima nas partículas poliméricas magnéticas após o processo de imobilização.

Devido à ausência de diisocianato no espectro das NPs magnéticas de PUU (item 3.3.3.2) e nas NPs magnéticas de PUU com enzima imobilizada (Figura 45) e ao fato dos picos com absorção em 1652 e 1542 cm^{-1} não apresentarem alteração após a imobilização, conclui-se que o processo foi conduzido por adsorção física entre suporte-lipase.

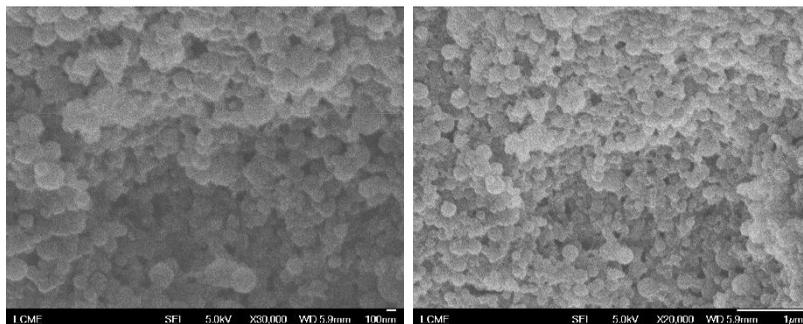
4.3.2.3 Morfologia das NPMs de PUU com lipase CALB imobilizada em duas etapas

O derivado contendo NPs magnéticas de PUU com lipase imobilizada foi avaliado por microscopia eletrônica de varredura MEV-FEG a fim de verificar se o processo de imobilização por adsorção poderia acarretar em mudanças na morfologia da partícula.

As micrografias da condição de imobilização A4 (5% de magnetita no suporte e 2 mg de enzima/mL em solução tampão fosfato) estão apresentadas na Figura 46. Como pode ser observado, após a imobilização da lipase na superfície do suporte não ocorreram alterações de morfologia nas partículas, permanecendo esféricas. Não foi possível observar a formação de agregados e as partículas permaneceram na faixa de tamanho de 130 a 150 nm, correspondentes aos diâmetros encontrados na condição de encapsulação de 5% de NPMs em PUU.

Apesar do sistema descrito neste trabalho nunca ter sido reportado na literatura anteriormente (suporte com material magnético encapsulado em matriz polimérica, sintetizado via polimerização interfacial em miniemulsão), as nanopartículas obtidas por miniemulsão (suporte), na faixa de tamanho de 100 a 270 nm, podem ser facilmente dispersas em solução tampão após sua liofilização, mantendo-se estáveis e não formando agregados durante o processo de imobilização.

Figura 46 - Micrografias de MEV-FEG das NPs magnéticas de PUU com 5% de Fe_3O_4 e 2 mgE/mL (condição A4) com barra de tamanhos de 100 nm (figura à esquerda) e 1000 nm (figura à direita).



O método desenvolvido nesta etapa do trabalho foi caracterizado frente à diferentes condições operacionais, como estabilidade térmica, pH e armazenamento.

4.3.2.4 Estabilidade térmica

A estabilidade térmica da enzima imobilizada é fator primordial na caracterização do processo, uma vez que a aplicação futura está diretamente ligada com a utilização deste catalisador frente a diferentes condições reacionais, como tempo e temperatura. Os resultados em termos de atividade relativa específica (em relação a enzima livre; 18,7 U/g) estão apresentados nas Figuras 47, 48 e 49.

As barras de erro estão apresentadas, porém o desvio padrão calculado não ultrapassou 2% em todas as titulações realizadas. A atividade relativa da enzima imobilizada foi maior ou igual à atividade relativa da enzima livre em todos os tempos e temperaturas estudados.

As atividades relativas para as enzimas imobilizadas após 6 horas de incubação em temperaturas de 40, 60 e 80 °C foram de 93,8; 100 e 100%, respectivamente (valores calculados em relação às respectivas atividades iniciais), enquanto que para a enzima livre após o mesmo período nas mesmas temperaturas as atividades relativas encontradas foram de 100, 98 e 98,1%, respectivamente para as temperaturas de 40, 60 e 80 °C.

Figura 47 - Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a 40 °C.

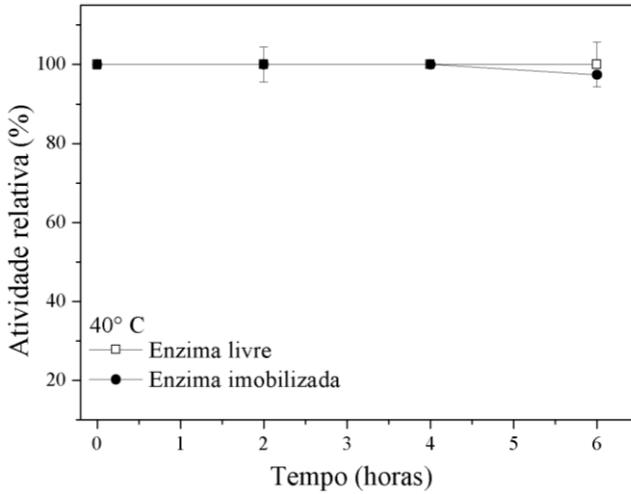


Figura 48 - Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a 60 °C.

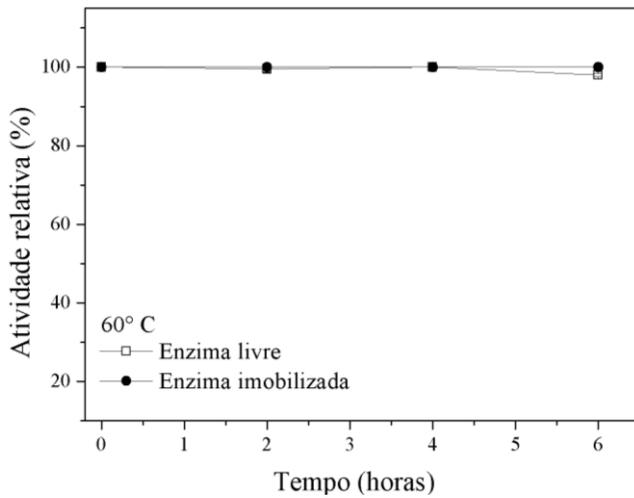
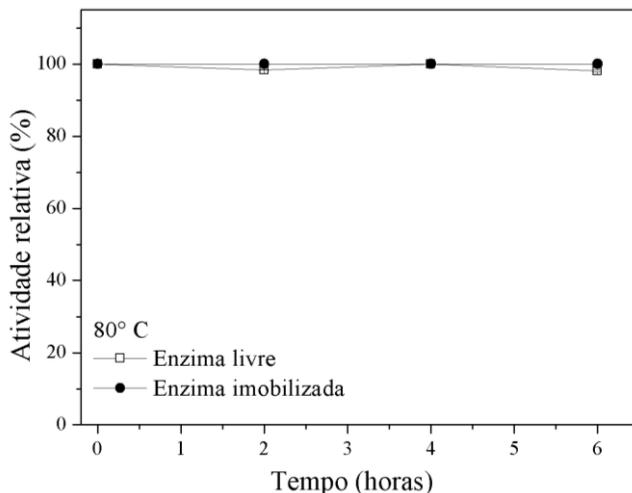


Figura 49 - Estabilidade térmica da enzima livre e imobilizada a 80 °C.



O aumento da temperatura acima da atividade ótima da enzima livre pode acarretar em uma ligeira alteração na conformação da estrutura da lipase, resultando em acréscimo na atividade enzimática após a imobilização (RODRIGUES et al., 2013). Além disto, a imobilização pode acarretar em mudanças conformacionais na estrutura da enzima, podendo alterar as propriedades finais do catalisador (HANEFELD et al., 2009). Este comportamento pode ser observado para a enzima imobilizada quando incubada a 60 e 80 °C, aumentando a atividade relativa de 93,8% a 40 °C para 100% após 6 horas de imobilização.

Para a enzima livre, após 6 horas frente a diferentes temperaturas, a temperatura ótima encontrada foi em 40 °C, retendo 100% da atividade inicial. Na maioria das atividades medidas, as enzimas livre e imobilizada apresentaram comportamento semelhante frente a diferentes temperaturas.

Yong e colaboradores (2008) modificaram NPMs de Fe₃O₄ com trietoxivinilsilano (VTES), e metacrilato de glicidila (GMA) e cloreto de metacrilóxiethyl trimetil amônio (MATAC) foram enxertados na superfície nas NPMs-VTES. A temperatura ótima para enzima livre de *Candida rugosa* foi de 35 a 40 °C, enquanto que para a enzima imobilizada de 35 a 45 °C. Em temperatura de 80 °C as lipases retiveram menos de 50% da atividade relativa inicial. Estes dados são inferiores ao obtidos no presente trabalho, na qual a temperatura de

80° C enzimas livre e imobilizada apresentaram atividade relativa de 98,1 e 100% em relação a atividade inicial da enzima livre.

4.3.2.5 Estabilidade ao pH

A aplicação industrial da enzima imobilizada, está relacionada com a faixa de pH ótima para seu uso, que está diretamente relacionada com a atividade da enzima. O pH desempenha papel importante no estado de ionização do sítio ativo e mantém a conformação adequada de enzima.

Lipases livre e imobilizada foram incubadas em tampão com diferentes valores de pH (4, 7 e 10) por 6 horas em shaker com temperatura constante de 30 °C e agitação de 150 rpm e as atividades relativas estão apresentadas nas Figuras 50, 51 e 52. As barras de erro estão apresentadas, porém o desvio padrão calculado não ultrapassou 2% em todas as titulações realizadas.

As maiores estabilidades após 6 horas foram observadas em pH 7 e 10 para a enzima imobilizada, com atividades relativas de 100 e 98%, respectivamente, e pH 7 para a enzima livre com atividade relativa de 100%. Em pH 10 a lipase imobilizada foi mais resistente ao pH em comparação a enzima livre, que reteve apenas 64% da atividade inicial, enquanto que a enzima imobilizada reteve 100%.

Em pH 4, ambas apresentaram queda na atividade, obtendo atividade residual de 61,8 e 64,6% para enzima livre e imobilizada.

Figura 50 - Estabilidade em pH 4 da enzima livre e imobilizada a 30 °C.

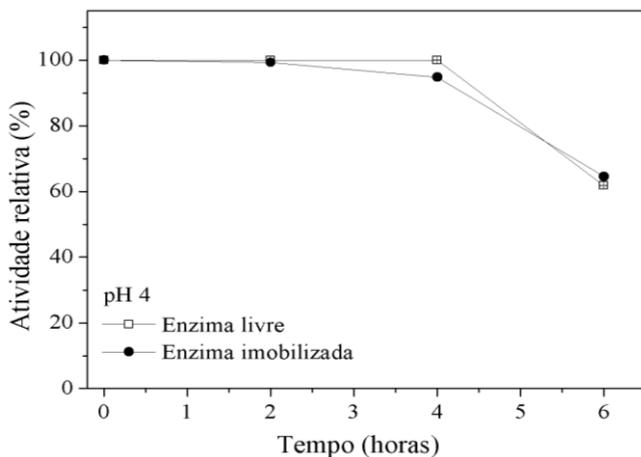


Figura 51 - Estabilidade em pH 7 da enzima livre e imobilizada a 30 °C.

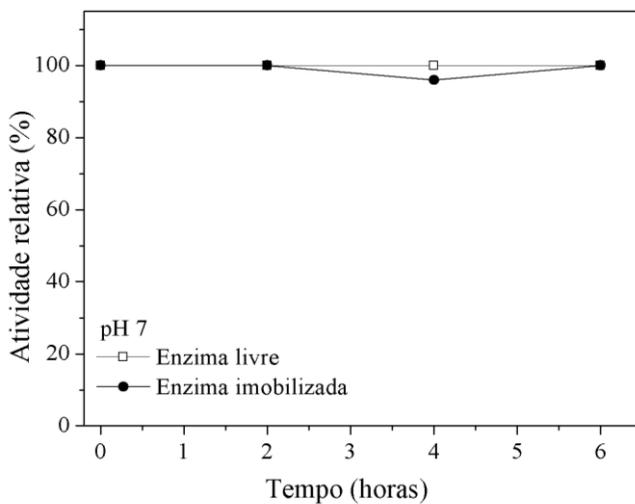
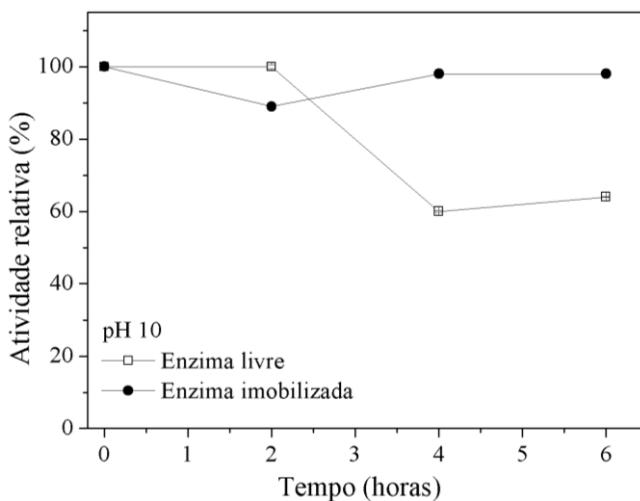


Figura 52 - Estabilidade em pH 10 da enzima livre e imobilizada a 30 °C.



Ashtari e colaboradores (2012) estudaram a imobilização de glicose oxidase (GOD) em NPs magnéticas encapsuladas em sílica. Para

a imobilização covalente de GOD em sílica-NPMs a superfície desta foi modificada com glutaraldeído e a imobilização foi conduzida em solução tampão fosfato, com 15 mg de GOD em shaker a 200 rpm e 4 °C por 24 horas. As atividades máximas foram observadas em pH 4,3 e 5,2 para enzima livre e imobilizada e os resultados mostraram que a enzima imobilizada foi menos sensível ao pH em relação a enzima livre.

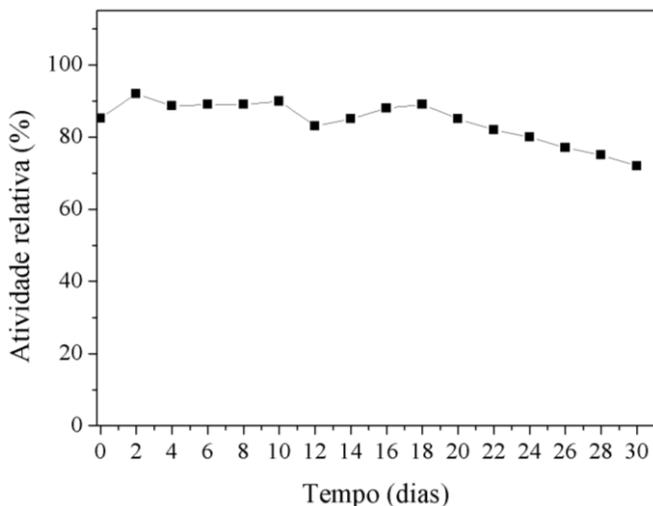
Xie e Ma (2009) estudaram a imobilização da lipase Lipozyme-TL em NPMs de Fe_3O_4 revestidas com (3-aminopropil) trietoxisilano (APES) e glutaraldeído foi utilizado como agente de ligação para ligar covalentemente a enzima na superfície das NPMs. A imobilização foi realizada utilizando solução da lipase em tampão fosfato 0,1 M pH 7,0. O pH ótimo para a máxima atividade hidrolítica da lipase imobilizada foi 7,5, enquanto que para enzima livre foi de 7, ambas com 100% de atividade relativa. Porém em pH 10 a enzima imobilizada apresentou menos de 50% de atividade relativa.

4.3.2.6 Estabilidade ao armazenamento

A imobilização de enzimas em um suporte, com a finalidade de aumentar a estabilidade em relação à enzima livre é um processo que envolve um longo período de estudo e muitas vezes um processo relativamente caro. Contudo, um dos principais interesses no processo de imobilização é aumentar a estabilidade do catalisador imobilizado quando armazenado, uma vez que enzimas livres podem perder sua atividade rapidamente quando armazenadas (ATACAN e ÖZACAR, 2015). Outro fator relevante está relacionado com a economia no processo industrial em virtude do menor consumo de enzima, através da possibilidade de reuso.

A Figura 53 corresponde ao comportamento da atividade relativa da enzima imobilizada em NPMs de PUU (em relação a atividade da enzima livre) após o armazenamento em refrigeração a 4 °C. As barras de erro estão apresentadas, porém o desvio padrão calculado não ultrapassou 2% em todas as titulações realizadas.

Figura 53 - Estabilidade ao armazenamento a 4 °C da enzima imobilizada.



O derivado na condição de imobilização em duas etapas, utilizando como suporte NPMs de PUU com 10% de Fe_3O_4 apresentou estabilidade após 30 dias de armazenamento, mantendo a atividade relativa na faixa de 85 a 90% em relação à enzima livre nos 20 dias iniciais. Após, a atividade do derivado reduziu de 82% (20 dias) para 72% com 30 dias de armazenamento.

Ficanha (2014) avaliou a atividade residual da enzima livre de *Candida antarctica* sob o armazenamento em geladeira a 4 °C. No sétimo dia de armazenamento a lipase apresentou aproximadamente 70% da atividade inicial (100%), e em um mês de armazenamento a atividade reduziu para menos de 40%, valores inferiores aos encontrados para CALB imobilizada no presente trabalho.

4.4 CONCLUSÕES

Lipase B de *Candida antarctica* (CALB) foi imobilizada em nanopartículas magnéticas de poli(ureia-uretano) por dois métodos diferentes: em uma única etapa, através da polimerização interfacial em miniemulsão e em duas etapas, após a síntese das nanopartículas magnéticas de poli(ureia-uretano) e a adsorção enzima-suporte em solução tampão pH 7,6.

A enzima imobilizada pelo processo de imobilização em uma única etapa foi utilizada como catalisador em diferentes reações de esterificação e altas conversões em ésteres foram obtidas, atingindo conversões acima de 85% para todos os sistemas reacionais estudados.

Para o mesmo sistema de imobilização, as análises de microscopia óptica de fluorescência mostraram a presença de enzima na superfície do polímero, indicando a ligação covalente entre o diisocianato e o grupamento amino na superfície da lipase. Além disso, as análises de DLS mostraram o aumento do diâmetro de partícula com o aumento da concentração de enzima na formulação.

Quando a imobilização foi conduzida em duas etapas, atividades relativas de 90,5, 87 e 91% de enzima imobilizada em relação à enzima livre foram obtidas em seis horas de imobilização com 0,55 mg de enzima/mL de solução tampão fosfato.

Resultados de FTIR confirmaram a presença da lipase no derivado de PUU com NPMs-AO. Micrografias de MEV-FEG confirmaram a estabilidade do suporte após o processo de imobilização.

Em temperaturas de 60 e 80 °C a enzima imobilizada apresentou a melhor estabilidade de atividade relativa específica, com valores de 100% em relação à enzima livre, valores superiores aos obtidos para enzima livre.

As maiores atividades após a incubação em diferentes pHs foram obtidas em solução tampão pH 7 e 10, com atividades de 100 e 98%, no segundo caso (pH 10) o valor final foi superior ao da enzima livre (64%).

A enzima imobilizada perdeu somente 28% de atividade após 30 dias de armazenamento a 4° C.

Os diferentes métodos de imobilização foram eficientes na imobilização da lipase no suporte magnético, apresentando resultados satisfatórios no processo de imobilização e na estabilidade frente a diferentes condições de pH e temperatura. Desta forma, as lipases imobilizadas são viáveis para aplicação industrial e em pesquisa, podendo substituir catalisadores químicos em reações de biocatálise, tendo como vantagem a facilidade de recuperação do derivado após a aplicação pela simples separação através de um campo magnético externo.

4.5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Ao final do estudo da imobilização da lipase CALB em NPs magnéticas de poli(ureia-uretano) propõe-se como sugestões para trabalhos futuros:

1. Aprimorar o método de imobilização de CALB em uma única etapa, caracterizando o derivado enzimático em relação à estabilidade térmica, pH, armazenamento e reuso.
2. Avaliar a morfologia do derivado enzimático obtido pela imobilização em duas etapas por microscopia óptica de fluorescência.
3. Avaliar as propriedades magnéticas do derivado obtido após a imobilização em duas etapas.
4. Avaliar os sucessivos ciclos de uso do derivado enzimático imobilizado em NPs magnéticas de PUU em duas etapas em uma síntese de ésteres convencional descrita na literatura.
5. A ligação entre o suporte e a enzima discutida durante o trabalho foi atribuída considerando as hipóteses de ligação disponíveis entre os dois componentes, a fim de certificar o tipo de ligação formada, propõe-se a realização de análises que possam elucidar os mecanismos de ligações envolvidos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho, um sistema de síntese de suporte polimérico magnético para imobilização de lipase foi apresentado, o qual possibilita a rápida separação do derivado enzimático obtido do meio reacional pela simples aplicação de um campo magnético externo, viabilizando, desta forma, processos de imobilização de enzimas e apresentando como diferencial a recuperação do derivado para posterior reuso.

Em um primeiro momento, foram obtidas as nanopartículas magnéticas de magnetita recobertas com ácido oleico, NPMs-AO, e as partículas puras de polímero de poli(ureia-uretano), PUU, por polimerização interfacial em miniemulsão, utilizando diisocianato de isoforona, IPDI como diisocianato e 1,6-hexanodiol como polioliol. Após a caracterização destas, iniciou-se o processo de encapsulação das NPMs-AO em PUU via polimerização interfacial em miniemulsão.

A influência de parâmetros como método de adição das NPMs-AO e concentração de NPMs-AO em relação ao monômero hidrofóbico foram estudados. Em geral, foi observado que para os dois métodos de adição de NPMs-AO utilizados foram obtidos comportamentos semelhantes, e segundo análise de TGA, a fração final em massa de NPMs-AO incorporada no polímero permaneceu na faixa de 30 a 34%. O aumento na concentração de NPMs-AO levou a um aumento no diâmetro das partículas formadas, assim como um aumento no índice de polidispersão. NPs magnéticas de PUU apresentaram comportamento superparamagnético com alta resposta magnética quando caracterizadas por VSM.

Após a síntese e caracterização do suporte, este foi utilizado para a imobilização da lipase B de *Candida antarctica* utilizando duas estratégias de imobilização diferentes.

No primeiro método, a lipase foi imobilizada ao mesmo passo em que as NPs magnéticas de PUU foram sintetizadas, durante a reação de polimerização interfacial em miniemulsão. Análise de microscopia óptica de fluorescência mostrou a presença de lipase na superfície das partículas sintetizadas, sendo que o diâmetro destas aumentou com o aumento da concentração de enzima na formulação da miniemulsão. O derivado enzimático obtido foi aplicado em diferentes sistemas de síntese de ésteres, sendo que altas conversões foram obtidas para todas as faixas estudadas, com resultados semelhantes e/ou superiores a lipase comercial de *Candida antarctica*, Novozym 435.

No segundo método realizado, a imobilização foi conduzida após a síntese das NPs magnéticas de PUU (suporte), pelo contato entre a enzima e o suporte em solução tampão fosfato pH 7,6. Em seis horas de imobilização atividades relativas (em relação à enzima livre) superiores a 87% foram obtidas com concentração de 0,55 mg de enzima/mL de solução tampão fosfato. Análise de FTIR confirmou a presença da lipase no derivado enzimático após o processo de imobilização.

A estabilidade térmica das enzimas livre e imobilizada apresentou comportamento semelhante para temperaturas de 40, 60 e 80° C, com atividades relativas próximas de 100%. A enzima imobilizada mostrou-se mais resistente à enzima livre quando incubada em diferentes valores de pH. O derivado enzimático magnético perdeu apenas 28% de sua atividade após 30 dias de armazenamento a 4° C.

Os resultados obtidos após a imobilização da CALB no suporte polimérico magnético demonstraram o potencial da aplicação destas nanopartículas contendo material magnético encapsulado como sistemas para imobilização de enzimas de diferentes naturezas, apresentando diversas vantagens em relação a suportes poliméricos, em função das propriedades magnéticas do material sintetizado.

REFERÊNCIAS

AKBARZADEH, A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic nanoparticles: preparation, physical properties, and applications in biomedicine. *Nanoscale Research Letters*, v. 7, p. 144–157, 2012.

ANDHARIYA, N.; UPADHYAY, R.; MEHTA, R.; CHUDASAMA, B. Folic acid conjugated magnetic drug delivery system for controlled release of doxorubicin. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 15, p. 1416–1428, 2013.

ARRUEBO, M.; FERNÁNDEZ-PACHECO, R.; IBARRA, M. R.; SANTAMARÍA, J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. *Nano Today*, v. 2, n. 3, p. 22–32, 2007.

ASHTARI, K.; KHAJEH, K.; FASIHI, J.; ASHTARI, P.; RAMAZANI, A.; VALI, H. Silica-encapsulated magnetic nanoparticles: Enzyme immobilization and cytotoxic study. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 50, n. 4, p. 1063–1069, 2012.

ASUA, J. M. Miniemulsion polymerization. *Progress in Polymer Science*, v. 27, n. 7, p. 1283–1346, 2002.

ATACAN, K.; ÖZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, p. 1–10, 2015.

BARTH, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, v. 1767, n. 9, p. 1073–1101, 2007.

BEDANTA, S.; PETRACIC, O.; KLEEMANN, W. Supermagnetism. In: *Handbook of Magnetic Materials*. 1. ed. Bhubaneswar, India: Elsevier, 2015.

BERNARDES, O. L.; BEVILAQUA, J. V.; LEAL, M. C. M. R.; FREIRE, D. M. G.; LANGONE, M. a P. Biodiesel fuel production by the transesterification reaction of soybean oil using immobilized lipase. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 736, p. 105–114, 2007.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: Solvent, oil and surfactant optimisation. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 280, n. 1-2, p. 241–251, 2004.

BUSSAMARA, R.; EBERHARDT, D.; FEIL, A. F.; MIGOWSKI, P.; WENDER, H.; DE MORAES, D. P.; MACHADO, G.; PAPALÉO, R. M.; TEIXEIRA, S. R.; DUPONT, J. Sputtering deposition of magnetic Ni nanoparticles directly onto an enzyme surface: a novel method to obtain a magnetic biocatalyst. *Chemical communications (Cambridge, England)*, v. 49, n. 13, p. 1273–5, 2013.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S. S. Uso De Biocatalisadores Imobilizados: Uma Alternativa Para a Condução De Bioprocessos. *Revista Analytica*, n. 23, p. 60–70, 2006.

CHAN, D.; KIRPOTIN, D.; BUNN, P. Synthesis and evaluation of colloidal magnetic iron oxides for the site-specific radiofrequency-induced hyperthermia of cancer. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 122, p. 374–378, 1993.

CHATTOPADHYAY, D. K.; RAJU, K. V. S. N. Structural engineering of polyurethane coatings for high performance applications. *Progress in Polymer Science*, v. 32, p. 352–418, 2007.

CHATTOPADHYAY, D. K.; WEBSTER, D. C. Thermal stability and flame retardancy of polyurethanes. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, v. 34, n. 10, p. 1068–1133, 2009.

CHEN, W.; YIN, P.; CHEN, H.; WANG, Z. Production of Biodiesel by Esterification of Stearic Acid over Aminophosphonic Acid Resin D418. *Industrial e Engineering Chemistry Research*, v. 51, p. 5402–5407, 2012.

CHEN, Y.; QIAN, Z.; ZHANG, Z. Novel preparation of magnetite/polystyrene composite particles via inverse emulsion polymerization. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 312, p. 209–213, 2008.

CHERTOK, B.; MOFFAT, B. a.; DAVID, A. E.; YU, F.; BERGEMANN, C.; ROSS, B. D.; YANG, V. C. Iron oxide nanoparticles as a drug delivery

vehicle for MRI monitored magnetic targeting of brain tumors. *Biomaterials*, v. 29, n. 4, p. 487–496, 2008.

CHIARADIA, V.; PAROUL, N.; CANSIAN, R. L.; JÚNIOR, C. V.; DETOFOL, M. R.; LERIN, L. a.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Synthesis of eugenol esters by lipase-catalyzed reaction in solvent-free system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 168, n. 4, p. 742–751, 2012.

CHOULY, C.; POULIQUEN, D.; LUCET, I.; JEUNE, J. J.; JALLET, P. Development of superparamagnetic nanoparticles for MRI: effect of particle size, charge and surface nature on biodistribution. *Journal of microencapsulation*, v. 13, n. 3, p. 245–255, 1996.

CIPOLATTI, E. P.; VALÉRIO, A.; NICOLETTI, G.; THEILACKER, E.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C.; NINOW, J. L.; OLIVEIRA, D. De. Enzymatic Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on PEGylated poly (urea-urethane) nanoparticles by step miniemulsion polymerization. *Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic*, v. 109, p. 116–121, 2014.

COROT, C.; ROBERT, P.; IDÉE, J. M.; PORT, M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 58, n. 14, p. 1471–1504, 2006.

CRESPY, D.; STARK, M.; HOFFMANN-RICHTER, C.; ZIENER, U.; LANDFESTER, K. Polymeric nanoreactors for hydrophilic reagents synthesized by interfacial polycondensation on miniemulsion droplets. *Macromolecules*, v. 40, n. 9, p. 3122–3135, 2007.

CULLITY, B. D.; GRAHAM, C. D. *Introduction to magnetic materials*. 2. ed. Notre Dame, Indiana: Wiley e Sons, 2009.

DALLA-VECCHIA, R.; NASCIMENTO, M. D. G.; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. *Quimica Nova*, v. 27, n. 4, p. 623–630, 2004.

DE LIMA, V. Estudo de catalisadores organometálicos na síntese de poliuretanos. Dissertação de Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais. Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

DE SOUZA, M. C. M. Imobilização de lipase de candida antarctica do tipo b em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres. Tese de Doutorado em Engenharia Química. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

DENG, L.; WANG, X.; NIE, K.; WANG, F.; LIU, J.; WANG, P.; TAN, T. Synthesis of Wax Esters by Lipase-catalyzed Esterification with. Chinese Journal of Chemical Engineering, v. 19, n. 6, p. 978–982, 2011.

DIJKSTRA, Z. J.; MERCHANT, R.; KEURENTJES, J. T. F. Stability and activity of enzyme aggregates of Calb in supercritical CO₂. Journal of Supercritical Fluids, v. 41, n. 1, p. 102–108, 2007.

DOMÍNGUEZ DE MARÍA, P.; CARBONI-OERLEMANS, C.; TUIN, B.; BARGEMAN, G.; VAN DER MEER, A.; VAN GEMERT, R. Biotechnological applications of Candida antarctica lipase A: State-of-the-art. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, v. 37, n. 1-6, p. 36–46, 2005.

DURÁN, N.; ROSA, M. a.; D'ANNIBALE, A.; GIANFREDA, L. Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports: A review. Enzyme and Microbial Technology, v. 31, n. 7, p. 907–931, 2002.

ELNASHAR, M. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology, v. 01, n. 01, p. 61–77, 2010.

FERNANDES, K.; LIMA, C.; LOPES, F. Técnicas de Imobilização de enzimas. Revista Processos Químicos, v. 7, p. 53–59, 2010.

FEUSER, P. E.; BUBNIAK, L. D. S.; SILVA, M. C. D. S.; VIEGAS, A. D. C.; FERNANDES, A. C.; RICCI-JUNIOR, E.; NELE, M.; TEDESCO, A. C.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. De. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly(methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. European Polymer Journal, 2015. in press.

FICANHA, A. M. M. Imobilização de lipase de candida antarctica b (cal b) pela técnica sol-gel. Dissertação de Mestrado em Engenharia de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Regional e Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2014.

FORESTI, M. L.; VALLE, G.; BONETTO, R.; FERREIRA, M. L.; BRIAND, L. E. FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Applied Surface Science*, v. 256, n. 6, p. 1624–1635, 2010.

FRENKEL, J.; DOEFMAN, J. Spontaneous and Induced Magnetisation in Ferromagnetic Bodies. *Nature*, v. 126, n. 3173, p. 274–275, 1930.

FRITZEN-GARCIA, M. B.; MONTEIRO, F. F.; CRISTOFOLINI, T.; ACUÑA, J. J. S.; ZANETTI-RAMOS, B. G.; OLIVEIRA, I. R. W. Z.; SOLDI, V.; PASA, A. a.; CRECZYNSKI-PASA, T. B. Characterization of horseradish peroxidase immobilized on PEGylated polyurethane nanoparticles and its application for dopamine detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, v. 182, p. 264–272, 2013.

GANDHI, N. N. Applications of lipase. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 74, n. 6, p. 621–634, 1997.

GAUDIN, F.; SINTES-ZYDOWICZ, N. Poly(urethane-urea) nanocapsules prepared by interfacial step polymerisation in miniemulsion. The droplet size: A key-factor for the molecular and thermal characteristics of the polymeric membrane of the nanocapsules? *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 384, n. 1-3, p. 698–712, 2011.

GAWANDE, M. B.; RATHI, A. K.; TUCEK, J.; SAFAROVA, K.; BUNDALESKI, N.; TEODORO, O. M. N. D.; KVITEK, L.; VARMA, R. S.; ZBORIL, R. Magnetic gold nanocatalyst (nanocat-Fe–Au): catalytic applications for the oxidative esterification and hydrogen transfer reactions. *Green Chemistry*, v. 16, n. 9, p. 4137–4143, 2014.

GENTILE, P.; BELLUCCI, D.; SOLA, A.; MATTU, C.; CANNILLO, V.; CIARDELLI, G. Composite scaffolds for controlled drug release: Role of the polyurethane nanoparticles on the physical properties and cell behaviour. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 44, p. 53–60, 2015.

GITE, V. V.; TATIYA, P. D.; MARATHE, R. J.; MAHULIKAR, P. P.; HUNDIWALE, D. G. Microencapsulation of quinoline as a corrosion inhibitor in polyurea microcapsules for application in anticorrosive PU coatings. *Progress in Organic Coatings*, v. 83, p. 11–18, 2015.

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, v. 26, n. 18, p. 3995–4021, 2005.

HANEFELD, U.; GARDOSI, L.; MAGNER, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chemical Society reviews*, v. 38, n. 2, p. 453–468, 2009.

HERTZBERG, S.; KVITTINGEN, L.; ANTHONSEN, T.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix and stabilizing agent in a two-phase liquid system: Application in lipase-catalysed reactions. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 14, n. 1, p. 42–47, 1992.

HOLA, K.; MARKOVA, Z.; ZOPPELLARO, G.; TUCEK, J.; ZBORIL, R. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. *Biotechnology Advances*, 2015. in press.

IDRIS, A.; BUKHARI, A. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 550–563, 2012.

ILLÉS, E.; SZEKERES, M.; KUPCSIK, E.; TÓTH, I. Y.; FARKAS, K.; JEDLOVSZKY-HAJDÚ, A.; TOMBÁ CZ, E. PEGylation of surfacted magnetite core-shell nanoparticles for biomedical application. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 460, p. 429–440, 2014.

IQBAL, J.; IQBAL, S.; MÜLLER, C. E. Advances in immobilized enzyme microbioreactors in capillary electrophoresis. *The Analyst*, v. 138, n. 11, p. 3104–16, 2013.

JAIN, T. K.; REDDY, M. K.; MORALES, M. a.; LESLIE-PELECKY, D. L.; LABHASETWAR, V. Biodistribution, clearance, and biocompatibility of iron oxide magnetic nanoparticles in rats. *Molecular Pharmaceutics*, v. 5, n. 2, p. 316–327, 2008.

JIANG, Q. L.; ZHENG, S. W.; HONG, R. Y.; DENG, S. M.; GUO, L.; HU, R. L.; GAO, B.; HUANG, M.; CHENG, L. F.; LIU, G. H.; WANG, Y. Q. Folic acid-conjugated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles for hyperthermia and MRI in vitro and in vivo. *Applied Surface Science*, v. 307, p. 224–233, 2014.

JOHNSEN, H.; SCHMID, R. B. Preparation of polyurethane nanocapsules by miniemulsion polyaddition. *Journal of microencapsulation*, v. 24, n. 8, p. 731–742, 2007.

JORDAN, J.; KUMAR, C. S. S. R.; THEEGALA, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 68, n. 2, p. 139–146, 2011.

KHOobi, M.; MOTEVALIZADEH, S. F.; ASADGOL, Z.; FOROOTANFAR, H.; SHAFIEE, A.; FARAMARZI, M. A. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. *Materials Chemistry and Physics*, v. 149-150, p. 77–86, 2015.

KOBAYASHI, S.; KOBAYASHI, S.; UYAMA, H.; UYAMA, H.; KIMURA, S.; KIMURA, S. Enzymatic Polymerization. *Chemical Reviews*, v. 101, n. 12, p. 3793–3818, 2001.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enzyme and Microbial Technology*, v. 35, n. 2-3, p. 126–139, 2004.

KRAJEWSKA, B. Ureases. II. Properties and their customizing by enzyme immobilizations: A review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, v. 59, n. 1-3, p. 22–40, 2009.

KUMAKURA, M.; KAETSU, I. Immobilization of cellulase using porous polymer matrix. *J. Appl. Polym. Sci.*, v. 29, n. 9, p. 2713–2718, 2003.

KUO, C.-H.; LIU, Y.-C.; CHANG, C.-M. J.; CHEN, J.-H.; CHANG, C.; SHIEH, C.-J. Optimum conditions for lipase immobilization on chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 87, n. 4, p. 2538–2545, 2012.

LANDFESTER, K. Miniemulsions for Nanoparticle Synthesis. *Topics in Current Chemistry*, v. 227, p. 75–123, 2003.

LANDFESTER, K.; RAMIREZ, L. P. Encapsulated magnetite particles for biomedical application. *Journal of Physics: Condensed Matter*, v. 15, p. 1345–1361, 2003.

LANDFESTER, K.; WEISS, C. K. Encapsulation by Miniemulsion Polymerization. *Advances in Polymer Science*, p. 14–49, 2010.

LEE, J.; ISOBE, T.; SENNA, M. Preparation of Ultrafine Fe₃O₄ Particles by Precipitation in the Presence of PVA at High pH. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 177, n. 177, p. 490–494, 1996.

LI, S.; HU, J.; LIU, B. Use of chemically modified PMMA microspheres for enzyme immobilization. *BioSystems*, v. 77, n. 1-3, p. 25–32, 2004.

LOVELL, P. A.; EL-AASSER, M. S. Emulsion polymerization and emulsion polymers. First ed. Chichester: Wiley e Sons, 1997. v. 36

LOWE, A. B. Thiol-ene “click” reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polymer Chemistry*, v. 1, n. 1, p. 17, 2010.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. *Angewandte Chemie - International Edition*, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.

LU, S.; FORCADA, J. Preparation and characterization of magnetic polymeric composite particles by miniemulsion polymerization. *Journal of Polymer Science Part a-Polymer Chemistry*, v. 44, p. 4187–4203, 2006.

MA, M.; ZHANG, Y.; YU, W.; SHEN, H. Y.; ZHANG, H. Q.; GU, N. Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 212, n. 2-3, p. 219–226, 2003.

MACHALA, L.; ZBORIL, R.; GEDANKEN, A. Amorphous Iron (III) Oxide - A review. *The Journal of Physical Chemistry B*, v. 111, p. 4003–4018, 2007.

MAHMOOD, I.; AHMAD, I.; CHEN, G.; HUIZHOU, L. A surfactant-coated lipase immobilized in magnetic nanoparticles for multicycle ethyl isovalerate enzymatic production. *Biochemical Engineering Journal*, v. 73, p. 72–79, 2013.

MALIK, M. A.; WANI, M. Y.; HASHIM, M. A. Microemulsion method: A novel route to synthesize organic and inorganic nanomaterials. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 5, n. 4, p. 397–417, 2012.

MEDEIROS, S. F.; SANTOS, a. M.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Stimuli-responsive magnetic particles for biomedical applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 403, n. 1-2, p. 139–161, 2011.

MILETIĆ, N.; ABETZ, V.; EBERT, K.; LOOS, K. Immobilization of candida antarctica Lipase B on polystyrene nanoparticles. *Macromolecular Rapid Communications*, v. 31, n. 1, p. 71–74, 2010.

MISSON, M.; ZHANG, H.; JIN, B. Nanobiocatalyst advancements and bioprocessing applications. *Journal of The Royal Society Interface*, v. 12, p. 1–20, 2015.

MORRAL-RUÍZ, G.; MELGAR-LESMESS, P.; GARCÍA, M. L.; SOLANS, C.; GARCÍA-CELMA, M. J. Polyurethane and polyurea nanoparticles based on polyoxyethylene castor oil derivative surfactant suitable for endovascular applications. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 461, p. 1–13, 2014.

MUÑOZ-ESPÍ, R.; WEISS, C. K.; LANDFESTER, K. Inorganic nanoparticles prepared in miniemulsion. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, v. 17, n. 4, p. 212–224, 2012.

NETTO, C. G. C. M.; ANDRADE, L. H.; TOMA, H. E. Enantioselective transesterification catalysis by Candida antarctica lipase immobilized on superparamagnetic nanoparticles. *Tetrahedron Asymmetry*, v. 20, n. 19, p. 2299–2304, 2009.

ODIAN, G. Principles of polymerization. 4 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

OLIVEIRA, D.; FEIHRMANN, a. C.; RUBIRA, a. F.; KUNITA, M. H.; DARIVA, C.; OLIVEIRA, J. V. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. *Journal of Supercritical Fluids*, v. 38, n. 3, p. 373–382, 2006.

OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. *Química Nova*, v. 36, n. 1, p. 123–130, 2013.

OUZINEB, K.; LORD, C.; LESAUZE, N.; GRAILLAT, C.; TANGUY, P. a.; MCKENNA, T. Homogenisation devices for the production of miniemulsions. *Chemical Engineering Science*, v. 61, n. 9, p. 2994–3000, 2006.

PANKHURST, Q. a; CONNOLLY, J.; JONES, S. K.; DOBSON, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *Journal of physics D: Applied Physics*, v. 167, n. 13, p. 167–181, 2003.

PARK, S.; LEE, Y.; KIM, Y. S.; LEE, H. M.; KIM, J. H.; CHEONG, I. W.; KOH, W. G. Magnetic nanoparticle-embedded PCM nanocapsules based on paraffin core and polyurea shell. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 450, p. 46–51, 2014.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D. Production of geranyl propionate by enzymatic esterification of geraniol and propionic acid in solvent-free system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, v. 85, n. 12, p. 1636–1641, 2010.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D. Solvent-free geranyl oleate production by enzymatic esterification. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, v. 34, n. 3, p. 323–329, 2011.

PAROUL, N.; GRZEGOZESKI, L. P.; CHIARADIA, V.; TREICHEL, H.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V.; DE OLIVEIRA, D. Solvent-free production of bioflavors by enzymatic esterification of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, v. 166, n. 1, p. 13–21, 2012.

QIAO, L.; LV, B.; FENG, X.; LI, C. A new application of aptamer: One-step purification and immobilization of enzyme from cell lysates for biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, v. 203, p. 68–76, 2015.

RAMÍREZ, L. P.; LANDFESTER, K. Magnetic polystyrene nanoparticles with a high magnetite content obtained by miniemulsion processes. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 204, n. 1, p. 22–31, 2003.

REBELO, L. P. Imobilização da lipase de burkholderia cepacia resolução cinética de alcoóis secundários quirais. Dissertação de Mestrado em Química. Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

REN, Y.; RIVERA, J. G.; HE, L.; KULKARNI, H.; LEE, D.-K.; MESSERSMITH, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. *BMC biotechnology*, v. 11, p. 1–8, 2011.

RIBEIRO, G. A. P. As Propriedades Magnéticas da Matéria: um primeiro contato. *Revista Brasileira do Ensino de Física*, v. 22, n. 3, p. 299–305, 2000.

RODRIGUES, R. C.; ORTIZ, C.; BERENQUER-MURCIA, Á.; TORRES, R.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization. *Chemical Society Reviews*, p. 6290–6307, 2013.

ROMASKEVIC, T.; BUDRIENE, S.; PIELICHOWSKI, K.; PIELICHOWSKI, J. Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. *Chemija*, v. 17, n. 4, p. 74–89, 2006.

ROMIO, A. P.; RODRIGUES, H. H.; PERES, A.; DA CAS VIEGAS, A.; KOBITSKAYA, E.; ZIENER, U.; LANDFESTER, K.; SAYER, C.; ARAÚJO, P. H. H. Encapsulation of magnetic nickel nanoparticles via inverse miniemulsion polymerization. *Journal of Applied Polymer Science*, v. 129, n. 3, p. 1426–1433, 2013.

ROSENBAUER, E. M.; LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A. Surface-Active monomer as a stabilizer for polyurea nanocapsules synthesized via interfacial polyaddition in inverse miniemulsion. *Langmuir*, v. 25, n. 20, p. 12084–12091, 2009.

SALAÜN, F.; BEDEK, G.; DEVAUX, E.; DUPONT, D.; GENGEMBRE, L. Microencapsulation of a cooling agent by interfacial polymerization:

Influence of the parameters of encapsulation on poly(urethane-urea) microparticles characteristics. *Journal of Membrane Science*, v. 370, p. 23–33, 2011.

SALUNKHE, a B.; KHOT, V. M.; PAWAR, S. H. Magnetic hyperthermia with magnetic nanoparticles: a status review. *Current topics in medicinal chemistry*, v. 14, p. 572–594, 2014.

SANG, L.-C.; COPPENS, M.-O. Effects of surface curvature and surface chemistry on the structure and activity of proteins adsorbed in nanopores. *Physical chemistry chemical physics : PCCP*, v. 13, n. 14, p. 6689–6698, 2011.

SASSOLAS, A.; BLUM, L. J.; LECA-BOUVIER, B. D. Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnology Advances*, v. 30, n. 3, p. 489–511, 2012.

SCHORK, F. J.; LUO, Y.; SMULDERS, W.; RUSSUM, J. P.; BUTTÉ, A.; FONTENOT, K. Miniemulsion polymerization. *Advances in Polymer Science*, v. 175, p. 129–255, 2005.

SHETE, P. B.; PATIL, R. M.; TIWALE, B. M.; PAWAR, S. H. Water dispersible oleic acid-coated Fe₃O₄ nanoparticles for biomedical applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 377, p. 406–410, 2015.

SHOKROLLAHI, H. Contrast agents for MRI. *Materials Science and Engineering C*, v. 33, n. 8, p. 4485–4497, 2013.

SHUBAYEV, V. I.; PISANIC, T. R.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, n. 6, p. 467–477, 2009.

SI, S.; KOTAL, A.; MANDAL, T. K.; GIRI, S.; NAKAMURA, H.; KOHARA, T. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles in the presence of polyelectrolytes. *Chemistry of Materials*, v. 16, n. 18, p. 3489–3496, 2004.

SINGH, A.; SAHOO, S. K. Magnetic nanoparticles: A novel platform for cancer theragnostics. *Drug Discovery Today*, v. 19, n. 4, p. 474–481, 2014.

SOHRABI, N.; RASOULI, N.; TORKZADEH, M. Enhanced stability and catalytic activity of immobilized amylase on modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Chemical Engineering Journal*, v. 240, p. 426–433, 2014.

SOUGUIR, H.; SALAÜN, F.; DOUILLET, P.; VROMAN, I.; CHATTERJEE, S. Nanoencapsulation of curcumin in polyurethane and polyurea shells by an emulsion diffusion method. *Chemical Engineering Journal*, v. 221, p. 133–145, 2013.

STANICKI, D.; ELST, L. Vander; MULLER, R. N.; LAURENT, S. Synthesis and processing of magnetic nanoparticles. *Current Opinion in Chemical Engineering*, v. 8, p. 7–14, 2015.

STAUDT, T.; MACHADO, T. O.; VOGEL, N.; WEISS, C. K.; ARAUJO, P. H. H.; SAYER, C.; LANDFESTER, K. Magnetic polymer/nickel hybrid nanoparticles via miniemulsion polymerization. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v. 214, p. 2213–2222, 2013.

SUN, C.; LEE, J. S. H.; ZHANG, M. Magnetic nanoparticles in MR imaging and drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, n. 11, p. 1252–1265, 2008.

SUN, S.; ZENG, H. Size-controlled synthesis of magnetite nanoparticles. *Journal of the American Chemical Society*, v. 124, n. 28, p. 8204–8205, 2002.

TAN, S. T.; WENDORFF, J. H.; PIETZONKA, C.; JIA, Z. H.; WANG, G. Q. Biocompatible and biodegradable polymer nanofibers displaying superparamagnetic properties. *ChemPhysChem*, v. 6, p. 1461–1465, 2005.

TANAKA, T.; SHIRAMOTO, S.; MIYASHITA, M.; FUJISHIMA, Y.; KANEO, Y. Tumor targeting based on the effect of enhanced permeability and retention (EPR) and the mechanism of receptor-mediated endocytosis (RME). *International Journal of Pharmaceutics*, v. 277, n. 1-2, p. 39–61, 2004.

TARTAJ, P.; MORALES, M. P.; GONZÁLEZ-CARREÑO, T.; VEINTEMILLAS-VERDAGUER, S.; SERNA, C. J. Advances in magnetic nanoparticles for biotechnology applications. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 290-291, p. 28–34, 2005.

TIARKS, F.; LANDFESTER, K.; ANTONIETTI, M. One-step preparation of polyurethane dispersions by miniemulsion polyaddition. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*, v. 39, n. 14, p. 2520–2524, 2001.

TORINI, L.; ARGILLIER, J. F.; ZYDOWICZ, N. Interfacial polycondensation encapsulation in miniemulsion. *Macromolecules*, v. 38, n. 8, p. 3225–3236, 2005.

TRAN, D. T.; CHEN, C. L.; CHANG, J. S. Immobilization of *Burkholderia* sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. *Journal of Biotechnology*, v. 158, n. 3, p. 112–119, 2012.

TUCEK, J.; ZBORIL, R.; NAMAI, A.; OHKOSHI, S. I. ϵ -Fe₂O₃: An advanced nanomaterial exhibiting giant coercive field, millimeter-wave ferromagnetic resonance, and magnetoelectric coupling. *Chemistry of Materials*, v. 22, n. 24, p. 6483–6505, 2010.

UPPENBERG, J.; PATKAR, S.; BERGFORS, T.; JONES, T. a. Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of molecular biology*, v. 235, n. 2, p. 790–792, 1994.

VALÉRIO, A.; DA ROCHA, S. R. P.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Degradable polyurethane nanoparticles containing vegetable oils. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 116, p. 24–30, 2014.

VALÉRIO, A.; FORTUNY, M.; SANTOS, A. F.; ARAÚJO, P. H. H.; SAYER, C. Poly(Urea-Urethane) Synthesis by Miniemulsion Polymerization Using Microwaves and Conventional Polymerization. *Macromolecular Reaction Engineering*, v. 9, p. 48–59, 2015.

VILLENEUVE, P.; MUDERHWA, J. M.; GRAILLE, J.; HAAS, M. J. Customizing lipases for biocatalysis: A survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, v. 9, p. 113–148, 2000.

WANG, J.; WU, D.; ZHAO, G.; LI, M.; LI, Y.; HAN, Y.; HE, A.; JIANG, Y. Reversible immobilization of glucoamylase onto magnetic polystyrene beads with multifunctional groups. *Process Biochemistry*, v. 49, n. 5, p. 845–849, 2014.

WEI, Y.; HAN, B.; HU, X.; LIN, Y.; WANG, X.; DENG, X. Synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and their magnetic properties. *Procedia Engineering*, v. 27, p. 632–637, 2012.

WEISSLEDER, R.; BOGDANOV, a.; NEUWELT, E. a.; PAPISOV, M. Long-circulating iron oxides for MR imaging. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 16, n. 617, p. 321–334, 1995.

WU, S.; LIU, B.; LI, S. Behaviors of enzyme immobilization onto functional microspheres. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 37, n. 5, p. 263–267, 2005.

XIE, W.; MA, N. Immobilized lipase on Fe₃O₄ nanoparticles as biocatalys for biodiesel production. *Energy & Fuels*, v. 23, n. 17, p. 1353–1374, 2009.

XU, C.; SUN, S. New forms of superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, n. 5, p. 732–743, 2013.

XU, Z. Z.; WANG, C. C.; YANG, W. L.; DENG, Y. H.; FU, S. K. Encapsulation of nanosized magnetic iron oxide by polyacrylamide via inverse miniemulsion polymerization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 277, p. 136–143, 2004.

YANASE, N.; NOGUCHI, H.; ASAKURA, H.; SUZUTA, T. Preparation of magnetic latex-particles by emulsion polymerization of styrene in the presence of a ferrofluid. *J. Applied Polymer Sci*, v. 50, p. 765–776, 1993.

YONG, Y.; BAI, Y.; LI, Y. F.; LIN, L.; CUI, Y.; XIA, C. Preparation and application of polymer-grafted magnetic nanoparticles for lipase immobilization. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 320, p. 2350–2355, 2008.

ZBORIL, R.; MASHLAN, M.; PETRIDIS, D. Iron (III) Oxides from Thermal Processes-Synthesis, Structural and Magnetic Properties, Mossbauer Spectroscopy Characterization, and applications. *Chemistry Materials*, v. 14, p. 969–982, 2002.

ZHANG, H.; DING, J.; QIU, Y.; ZHAO, Z. Kinetics of esterification of acidified oil with different alcohols by a cation ion-exchange

resin/polyethersulfone hybrid catalytic membrane. *Bioresource Technology*, v. 112, p. 28–33, 2012.

ZHANG, L.; HE, R.; GU, H. C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. *Applied Surface Science*, v. 253, n. 5, p. 2611–2617, 2006.

ZHANG, M.; PAN, H.; ZHANG, L.; HU, L.; ZHOU, Y. Study of the mechanical, thermal properties and flame retardancy of rigid polyurethane foams prepared from modified castor-oil-based polyols. *Industrial Crops and Products*, v. 59, p. 135–143, 2014.

ZHANG, X.; WANG, Y.; YANG, S. Simultaneous removal of Co(II) and 1-naphthol by core–shell structured Fe₃O₄@cyclodextrin magnetic nanoparticles. *Carbohydrate Polymers*, v. 114, p. 521–529, 2014.