



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
QUÍMICA**

Jonathan Alexsander Bork

**SÍNTESE EM ULTRASSOM DE NANOPARTÍCULAS
PARAMAGNÉTICAS DE MAGNETITA MODIFICADAS COM
LAURIL SULFATO DE SÓDIO PARA IMOBILIZAÇÃO DE
LIPASES**

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do Grau de Doutor em Engenharia Química.

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Coorientadora: Dr^a. Denise Esteves Moritz

Florianópolis

2016

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

Bork, Jonathan Alexsander

Síntese em Ultrassom de Nanopartículas Paramagnéticas de Magnetita Modificadas com Lauril Sulfato de Sódio para Imobilização de Lipases / Jonathan Alexsander Bork ; orientador, Agenor Furigo Jr. ; coorientadora, Denise Esteves Moritz. - Florianópolis, SC, 2016.

168 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química.

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. nanopartículas. 3. magnetita. 4. imobilização. 5. Lipases. I. Furigo Jr., Agenor. II. Moritz, Denise Esteves. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e paciência para vencer este desafio. A Ti consagro esta vitória.

Aos meus pais pela vida e pelo apoio incondicional nestes longos anos de formação em Engenharia Química, tanto nas dúvidas profissionais quanto existenciais.

Ao meu orientador Prof. Agenor Furigo Jr pelos sábios conselhos, orientação e compreensão em todos os momentos.

À minha grande amiga e coorientadora Denise Esteves Moritz pelo imensurável apoio e confiança depositada em mim além das maravilhosas horas de conversa extremamente produtivas que tivemos até hoje.

Aos meus amigos verdadeiros que passaram por mim e permaneceram na minha vida durante a esta jornada.

À banca que se dispôs a avaliar este trabalho.

À CAPES e UFSC pelo apoio financeiro e institucional.

RESUMO

As lipases (triacilglicerol hidrolases) são uma classe de enzimas amplamente distribuídas entre os microrganismos, plantas e animais. Estes biocatalisadores possuem elevada seletividade, reagem em condições brandas produzindo menos subprodutos. A imobilização e o reuso são alternativas promissoras para ampliar o uso de enzimas nas indústrias reduzindo o custo do processo. Neste trabalho foi proposto o uso de suportes em dimensões nanométricas, sintetizados com ultrassom, possuindo propriedades paramagnéticas, com o objetivo de imobilizar as lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica* B. Foram utilizadas técnicas de caracterização para a verificação da estrutura química e cristalina do suporte, suas propriedades magnéticas, área superficial e perfil termogravimétrico. Este suporte foi aplicado e na adsorção de lipases sendo a seguir aplicado na síntese de monocaprilina. Comparando com a técnica sem ultrassom, o uso deste fez com que a carga elétrica superficial fosse menor e o tamanho e estabilidade das partículas fossem maiores. A análise por difração de raios-X comprova que a técnica usada produziu somente magnetita. A análise de magnetização comprovou a característica paramagnética do suporte, comparável à da magnetita pura. Constatou-se que 80 % da imobilização da lipase ocorreu durante a primeira hora de contato da solução enzimática com o suporte. A análise de infravermelho mostrou os grupos químicos presentes no suporte antes da imobilização e comprovou que esta ocorreu através da identificação de grupos químicos associados a proteínas adsorvidas. A análise de microscopia eletrônica de transmitância mostrou que as partículas possuem tamanho médio de 10 nm. A análise do potencial zeta das partículas mostrou a baixa carga superficial destas indicando que estas tendem a aglomerar, porém, mantendo a área superficial superior às daquelas sintetizadas sem ultrassom. Os testes de estabilidade a solventes mostraram que a polaridade deste afeta a atividade enzimática sendo que quanto mais apolar for o solvente maior foi a elevação da atividade hidrolítica da lipase. Os testes de reuso mostraram que as enzimas imobilizadas foram usadas por até 16 ciclos de hidrólise. A síntese de monocaprilina foi usada como exemplo de aplicação. A melhor condição encontrada foi utilizando excesso molar de glicerol (razão 6:1, glicerol: ácido), 60 °C e 800 rpm utilizando a lipase CALB imobilizada a qual rendeu 40 % em massa de monocaprilina.

Palavras-Chave: nanopartículas, magnetita, imobilização, lipases, monocaprilina.

ABSTRACT

Lipases (triacylglycerol hydrolase) are a class of enzymes widely distributed in microorganisms, plants and animals. These biocatalysts have high selectivity, react under mild conditions producing less by-products. Immobilization and reuse are promising alternatives to expand the use of enzymes in industry by reducing the cost of the process. This work proposes the use of nanometric supports with paramagnetic properties synthesized under ultrasound waves with the purpose of immobilize the lipase *Rhizomucor miehei* and *Candida antarctica B*. Characterization techniques were used to verify the chemical and crystalline structure of the support, their magnetic properties, surface area and thermogravimetric profile. This support was used and studied in lipase adsorption isotherms and after it was applied in monocaprylin synthesis. Comparing with the ultrasound technique, without the ultrassound the surface charge was lower and the particle size and stability of the particles were larger. Analysis by X-ray diffractometry, shows that the technique used yielded only magnetite. The magnetization analysis proved the paramagnetic characteristic of comparable support of pure magnetite. It was found that 80 % of lipase immobilization occurred during the first hour of contact of the enzyme solution with the support. The infrared analysis showed the support chemical groups prior to immobilization and proved that this occurred through the identification of chemical groups associated with the adsorbed proteins. The analysis of electron microscopy transmittance showed that the particles have an average size of 10 nm. The analysis of the zeta potential of the particles showed the low surface charge of these indicating that they tend to agglomerate, but keeping the upper surface area of the synthesized those without ultrasound. The stability tests showed that the polarity solvents affect this enzymatic activity being the nonpolar solvents responsible by the elevation of the hydrolytic activity of lipase. Reuse tests showed that the immobilized enzymes were used for hydrolysis up to 16 cycles. The monocaprylin synthesis was used as the application example. The best condition was found using molar excess of glycerol (ratio 6:1 glycerol acid), 60 ° C and 800 rpm using immobilized lipase CALB which yielded 40% by weight of monocaprylin.

Keywords: nanoparticles, magnetite, immobilization, lipases, monocaprylin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. A. Estrutura da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em sua conformação fechada. B. Estrutura da lipase de <i>Burkholderia cepacia</i> em sua conformação aberta (com a tríade catalítica em destaque).....	32
Figura 2. Esquema geral da produção de diacilgliceróis através da hidrólise de triglicerídeos catalisada por lipases.....	33
Figura 3. Representações da estrutura da CALB. Representações da estrutura de CALB com a conformação aberta (azul) e fechada (vermelho) (A.). Imagens de diferentes pontos de vista (B. e C.)..	35
Figura 4. Mecanismo catalítico da CALB para hidrólise ou transesterificação.....	36
Figura 5. Tipos de reatores para enzimas imobilizadas: (a) Reator de mistura; (b) Reator de leito empacotado; (c) reator de leito fluidizado.....	37
Figura 6. Imobilização por adsorção física de uma enzima em um suporte.....	39
Figura 7. Imobilização covalente de enzimas sobre o suporte: (A) resíduo de aminoácido ativo, (B) a função de ligação do suporte, (C) suporte, (D) espaçador.....	40
Figura 8. Imobilização de enzimas sobre superfícies aminadas por (A) carbodiimida ou (B) glutaraldeído.....	41
Figura 9. Encapsulamento de um biocatalisador.....	43
Figura 10. Enzimas encapsuladas - definida como enzimas fisicamente delimitadas por uma membrana semi-permeável.....	45
Figura 11. A reação de transesterificação. R representa uma mistura de várias cadeias de ácidos graxos. O álcool empregado para a produção de biodiesel é geralmente o metanol ($R^1 = CH_3$).....	50
Figura 12. Reação de esterificação direta do glicerol (A) e interesterificação (B).....	54
Figura 13. Reação de silição para derivatização do glicerídeo usando BSTFA (a) e MSTFA (b): TMS = $Si(CH_3)_3$, X = O, S, NH, NR', COO, R, R' = Alquil, Aril (ORATA, 2012).....	58
Figura 14. Esquema geral de síntese das nanopartículas de magnetita em banho de ultrassom modificadas com lauril sulfato de sódio.....	65

Figura 15. Princípio de funcionamento do equipamento de sedimentação.....	67
Figura 16. Esquema da reação de esterificação do glicerol com ácido caprílico.....	74
Figura 17. Difratoograma de raios-X para a NSM-OX.....	80
Figura 18. Difratoograma de raios-X para a NSM-SDS.....	82
Figura 19. Isoterma de adsorção de N ₂ em nanopartículas de NSM-OX e NSM-OX US.....	84
Figura 20. Isoterma de adsorção de N ₂ em nanopartículas de NSM-SDS e NSM-SDS US.....	84
Figura 21. Comportamento do potencial zeta das partículas do suporte sintetizado com banho de ultrassom com variações de pH e simultânea medida do potencial.....	87
Figura 22. Índice de instabilidade das partículas de NSM-OX sintetizadas a 800, 1200 e 1600 rpm com e sem ultrassom.....	89
Figura 23. Índice de instabilidade das partículas de NSM-SDS transformadas a partir das partículas de NSM-OX sintetizadas com e sem ultrassom e suspensas em água destilada.....	90
Figura 24. Análise de superfície da nanopartículas de NSM-OX sintetizada com agitação mecânica a 1200 rpm e com uso de ultrassom.....	93
Figura 25. Análise de superfície da nanopartículas de NSM-SDS sintetizada com agitação mecânica a 1200 rpm e com uso de ultrassom.....	93
Figura 26. Curvas de magnetização para as partículas de NSM-OX (a) e NSM-SDS (b) sintetizadas sem ultrassom.....	95
Figura 27. Curvas de magnetização para as partículas de NSM-OX (c) e NSM-SDS (d) sintetizadas com ultrassom.....	96
Figura 28. Isoterma de adsorção da lipase RM no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Langmuir.....	99
Figura 29. Isoterma de adsorção da lipase CALB no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Langmuir.....	100
Figura 30. Isoterma de adsorção da lipase RM no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Freundlich.....	101
Figura 31. Isoterma de adsorção da lipase CALB no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Freundlich.....	102

Figura 32. Valores de R_L utilizando diferentes concentrações iniciais de lipase RM dissolvida em NaCl 0,2 M, pH 7 e 25 °C...	103
Figura 33. Valores de R_L utilizando diferentes concentrações iniciais de lipase CALB dissolvida em NaCl 0,2 M, pH 5 e 25 °C.....	104
Figura 34. Curva de imobilização da RM ao longo do tempo de contato do suporte com a lipase na forma solúvel em diferentes concentrações.....	105
Figura 35. Curva de imobilização da CALB ao longo do tempo de contato do suporte com a lipase na forma solúvel em diferentes concentrações.....	106
Figura 36. Ensaio de adsorção da enzima RM em diferentes pHs..	109
Figura 37. Ensaio de adsorção da enzima CALB em diferentes pHs.....	110
Figura 38. Comparação dos espectros de infravermelho dos compostos sintetizados.....	111
Figura 39. Análise termogravimétrica do suporte com e sem enzima – TG versus T.....	113
Figura 40. Análise diferencial térmica (DTA) – DTA versus T da amostra NSM-SDS.....	114
Figura 41. Análise de superfície das partículas de NSM-OX. Aumento de 5000 X.....	116
Figura 42. Análise de superfície das partículas de NSM-SDS. Aumento de 5000 X.....	116
Figura 43. Análise de superfície das partículas de NSM-RM. Aumento de 5000 X.....	117
Figura 44. Análise de superfície das partículas de NSM-CALB. Aumento de 5000 X.....	117
Figura 45. Atividade hidrolítica da lipase NSM-RM após contato com solventes de diferentes polaridades por 24 horas.....	119
Figura 46. Atividade hidrolítica da lipase NSM-CALB após contato com solventes de diferentes polaridades por 24 horas.....	120
Figura 47. Ensaio de estabilidade térmica das enzimas imobilizadas suspensas em isoctano a diferentes temperaturas. (a.) NSM-RM; (b.) NSM-CALB.....	123

Figura 48. Comportamento das enzimas NSM-RM e NSM-CALB em sucessivos ciclos de reuso utilizando como método de monitoramento a hidrólise do palmitato de p-nitrofenila.....	125
Figura 49. Distribuição dos produtos obtidos pela esterificação direta do glicerol com o ácido caprílico em modo batelada com Novozym 435.....	132
Figura 50. Distribuição dos produtos obtidos pela esterificação direta do glicerol com o ácido caprílico em modo batelada com NSM-CALB.....	132
Figura 51. Comparativo na produção de monocaprilina para as lipases Novozym 435 e NSM-CALB.....	133
Figura 52. Cromatograma referente ao resultado do experimento de esterificação utilizando a lipase NSM-CALB na razão molar de glicerol/ácido de 6:1, temperatura de 60 °C com 5 % (m/m) de lipase imobilizada.....	134
Figura 53. Curva de calibração para o método de Bradford utilizando albumina bovina como proteína padrão.....	161
Figura 54. Curva de calibração para o método de atividade hidrolítica utilizando solução de p-nitrofenol como padrão.....	163
Figura 55. Curva de calibração e ajuste linear para o ácido caprílico.....	166
Figura 56. Curva de calibração e ajuste linear para a monocaprilina.....	167
Figura 57. Curva de calibração e ajuste linear para a dilaurina....	167
Figura 58. Curva de calibração e ajuste linear para a tricaprilina.	168

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Propriedades físicas do glicerol.....	49
Tabela 2. Principais ácidos graxos (% , m/m) de óleos e gorduras utilizados e/ou testados como combustível diesel alternativo.....	52
Tabela 3. Resumo das principais aplicações para lipases imobilizadas em nanopartículas paramagnéticas.....	60
Tabela 4. Informações sobre as lipases usadas para o desenvolvimento deste trabalho.....	63
Tabela 5. Área superficial das partículas NSM-OX e NSM-SDS sintetizadas com e sem banho de ultrassom.....	83
Tabela 6. Potencial zeta das partículas de NSM-OX sintetizadas em diferentes condições experimentais.....	85
Tabela 7. Potencial zeta das partículas de NSM-SDS sintetizadas sob diferentes condições experimentais.....	86
Tabela 8. Índice de instabilidade medidos por sedimentação acelerada das amostras de NSM-OX sintetizadas a 800, 1200 e 1600 rpm com e sem ultrassom (US).....	88
Tabela 9. Tamanho médio das partículas medido por sedimentação acelerada das amostras de NSM-OX sintetizadas a 800, 1200 e 1600 rpm com e sem ultrassom (US).....	91
Tabela 10. Valores medidos de magnetização e de coercividade das partículas sintetizadas com e sem banho de ultrassom.....	97
Tabela 11. Valores do fator de separação (R_L) e seu significado em relação à adequação do processo de adsorção.....	99
Tabela 12. Resultados da análise das isotermas de adsorção das enzimas RM e CALB no suporte NSM-SDS a 25°C, pH 7 e em solução 0,2 M de NaCl.....	103
Tabela 13. Resultado da imobilização da enzima RM no suporte sintetizado em termos de concentração mássica e percentual.....	107
Tabela 14. Resultado da imobilização da enzima CALB no suporte sintetizado em termos de concentração mássica e percentual.....	107
Tabela 15. Atividade hidrolítica e de esterificação das enzimas imobilizadas em NSM-SDS, livre e imobilizadas disponíveis comercialmente.....	108
Tabela 16. Perda de massa (Δm) em cada região e para cada amostra.....	114

Tabela 17. Ensaio de estabilidade a solventes com os resultados da medida da atividade hidrolítica após 24 horas de contato com os solventes com suas respectivas polaridades (log P).....	118
Tabela 18. Coeficientes de correlação obtidos na calibração do método de acordo com o método Cd 11b-91 da AOCS adaptada.	128
Tabela 19. Distribuição dos produtos da reação de esterificação de glicerol com ácido caprílico em diferentes razões molares realizadas em bateladas de 3 horas, temperatura do meio reacional de 60 °C e agitação mecânica de 800 rpm.....	129
Tabela 20. Distribuição dos produtos da reação de esterificação de glicerol com ácido caprílico em diferentes razões molares realizadas em bateladas de 3 horas, temperatura do meio reacional de 60 °C e agitação mecânica de 800 rpm.....	131
Tabela 21. Curva de calibração de acordo com o método de Bradford para análise de proteínas.....	161
Tabela 22. Valores de variação absorvância da solução p-nitrofenol em solução tampão fosfato 0,05 M com solução de Na ₂ CO ₃ 0,1 M (1:1; v/v).....	163
Tabela 23. Curva de calibração do padrão de ácido caprílico utilizando padrão interno de n-tetradecano.....	165
Tabela 24. Curva de calibração do padrão de monocaprilina utilizando padrão interno de n-tetradecano.....	165
Tabela 25. Curva de calibração do padrão de dilaurina utilizando padrão interno de n-tetradecano.....	165
Tabela 26. Curva de calibração do padrão de tricaprilina utilizando padrão interno de n-tetradecano.....	166

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTES – 3-aminopropiltriétóxissilano
APTMS – 3-aminopropiltrimetóxissilano
BSTFA – N,O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CALB – Lipase B de *Candida antarctica*
CG – Cromatografia a gás
CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência
CLEA – Agregados de enzimas reticulados
CLEC – Cristais de enzimas reticulados
DAG – Diacilgliceróis
DRX – Difração de raios-X
DTA – Análise térmica diferencial
EM – Espectrômetro de massas
FTIR – Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
ICDD – International Centre for Diffraction Data
JCPDS – Joint Committee on Powder Diffraction Standards
MAG – Monoacilgliceróis
MAV – Magnetização de amostra vibrante
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MET – Microscopia eletrônica de transmissão
MSTFA - N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida
NSM-OX – Nanopartículas de magnetita com oxalato
NSM-OX US – Nanopartículas de magnetita com oxalato sintetizadas em ultrassom
NSM-SDS – Nanopartículas de magnetita com lauril sulfato
NSM-SDS US – Nanopartículas de magnetita com lauril sulfato sintetizadas em ultrassom
p-NP – p-nitrofenol
p-NPP – Palmitato de p-nitrofenila
RM – Lipase de *Rhizomucor miehei*
TAG – Triacilgliceróis
TEOS – Ortossilicato de tetraetila
TG – Termogravimetria
TMS – Radical trimetilsilil

LISTA DE SÍMBOLOS

- α – Coeficiente angular da curva
- A_{SR} – Área do pico correspondente à substância de referência
- A_{PI} – Área do pico correspondente ao padrão interno
- C_e – Concentração de lipase no equilíbrio
- C_{PI}^I – Concentração do padrão interno na solução injetada
- C_{SR}^I – Concentração da substância de referência na solução injetada
- K_L – Constante de Langmuir
- K_F – Constante de Freundlich
- m_{PI} – Massa do padrão interno na solução de referência
- m_{SR} – Massa da substância de referência na solução de referência
- n – medida do grau de heterogeneidade da superfície de acordo com a isoterma de Freundlich
- q_e – Quantidade de lipase adsorvida no equilíbrio
- q_m – Quantidade máxima de lipase adsorvida
- R_L – Fator de separação
- V_{total} : Volume total da solução de referência

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 Objetivos.....	29
2.1 Objetivo geral.....	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	31
3.1 Lipases.....	31
3.1.1 Lipase de <i>Rhizomucor miehei</i> (RM).....	33
3.1.2 Lipase de <i>Candida antarctica</i> B.....	34
3.2 Imobilização de Enzimas.....	36
3.2.1 Adsorção Física.....	38
3.2.2 Ligação Covalente.....	40
3.2.3 Ligações Cruzadas (<i>Cross-linking</i>).....	42
3.2.4 Encapsulamento em Matriz Sol-gel.....	43
3.2.5 Encapsulamento em Membranas.....	44
3.3 Imobilização de Enzimas em Nanopartículas Paramagnéticas.....	45
3.4 Síntese de Nanopartículas com o Uso de Ultrassom.....	47
3.5 Glicerol.....	48
3.6 Síntese de Ésteres de Glicerol.....	50
3.6.1 Monoacilgliceróis.....	53
3.6.2 Diacilgliceróis.....	57
3.7 Análise Quantitativa dos Ésteres de Glicerol por Cromatografia.....	58
3.8 Estado da Arte.....	59
4 MATERIAL E MÉTODOS	63
4.1 Material.....	63
4.1.1 Lipases.....	63
4.1.2 Reagentes.....	63
4.2 Síntese e Caracterização dos Suportes.....	64
4.2.1 Síntese dos Suportes de Magnetita Funcionalizada com Lauril Sulfato.....	64
4.2.2 Difração de Raios-X (DRX).....	66
4.2.3 Análise de Adsorção/dessorção de N ₂ a 77 K.....	66
4.2.4 Potencial Zeta.....	66
4.2.5 Estabilidade de Suspensão Acelerada e Tamanho Médio de partículas.....	67
4.2.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	68
4.2.7 Magnetometria de Amostra Vibrante.....	68
4.3 Imobilização das Lipases e Caracterização.....	68
4.3.1 Determinação de Proteínas Totais.....	68

4.3.2 Ensaio de Atividade Hidrolítica.....	69
4.3.3 Ensaio de Atividade de Esterificação.....	69
4.3.4 Isotermas de Adsorção.....	70
4.3.5 Imobilização das Lipases e Influência da Concentração.....	70
4.3.6 Influência do pH.....	71
4.3.7 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier.....	71
4.3.8 Análise Termogravimétrica.....	71
4.3.9 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	72
4.3.10 Ensaio da Estabilidade a Solventes.....	72
4.3.11 Ensaio da Estabilidade Térmica.....	72
4.3.12 Teste de Reuso.....	73
4.4 Aplicação das Lipases Imobilizadas.....	73
4.4.1 Esterificação do Glicerol com Ácido Caprílico.....	73
4.4.2 Análises de Cromatografia a Gás dos Produtos de Esterificação – Análise Quantitativa.....	74
4.4.3 . Construção da Curva de Calibração.....	75
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	79
5.1 Síntese e Caracterização dos Suportes.....	79
5.1.1 Síntese do Suporte de Magnetita Funcionalizada com Lauril Sulfato.....	79
5.1.2 Difração de Raios-X (DRX).....	80
5.1.3 Análise de Adsorção/dessorção de N ₂ a 77 K.....	83
5.1.4 Potencial Zeta.....	85
5.1.5 Estabilidade de Suspensão Acelerada e Tamanho Médio de Partículas.....	88
5.1.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	92
5.1.7 Magnetometria de Amostra Vibrante.....	94
5.2 Imobilização das Lipases e Caracterização.....	98
5.2.1 Isotermas de Adsorção.....	98
5.2.2 Influência da Concentração de Enzima Solubilizada.....	104
5.2.3 Influência do pH.....	109
5.2.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	111
5.2.5 Termogravimetria.....	112
5.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	115
5.2.7 Ensaio da Estabilidade a Solventes.....	118
5.2.8 Ensaio da Estabilidade Térmica.....	122
5.2.9 Teste de Reuso.....	124
5.3 Esterificação do Glicerol com Ácido Caprílico.....	126
6 CONCLUSÕES.....	137

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	141
8 REFERÊNCIAS.....	143
APÊNDICE 1 – Curva de Calibração para Método de Bradford.....	161
APÊNDICE 2 – Curva de Calibração para Atividade Hidrolítica.....	163
APÊNDICE 3 – Curvas de Calibração Cromatográfica.....	165

1 INTRODUÇÃO

O uso de enzimas como biocatalisadores tem sido há muito tempo objeto de estudo no ramo de engenharia das reações bioquímicas. As enzimas têm a capacidade de catalisar reações sob condições brandas de temperatura e pressão, com elevado grau de especificidade para o substrato, reduzindo assim a formação de subprodutos (BRENA e BATISTA-VIERA, 2006). A elevada seletividade (incluindo quimio, régio e enantio especificidade) característica das enzimas, passou a ser explorada de forma cada vez mais intensa. A capacidade das enzimas de catalisar reações em meio aquoso, em condições moderadas de temperatura e de pressão, reduzem a possibilidade de degradação de substâncias termossensíveis e minimizam, também, os efeitos de corrosão nos reatores e instrumentos usados (LIMA e ANGNES, 1999).

Um aspecto importante envolvendo o uso de enzimas em reações na indústria química está relacionado à aplicação do processo enzimático. Por ser um tipo de reação química que não gera subprodutos tóxicos, a grande maioria dos processos enzimáticos se atém à síntese de produtos com aplicação alimentícia ou farmacêutica, visto que as características dos produtos finais favorecem sua aplicação em produtos dos mais variados com finalidade de consumo humano ou animal (OZYILMAZ et al., 2015).

Em contrapartida, a aplicação eficaz de enzimas em sua forma livre como um biocatalisador apresenta várias desvantagens, tais como a baixa estabilidade em condições operacionais não ideais, dificuldade de recuperação do produto livre de enzima, alto custo de operação e a impossibilidade de reutilização da enzima em processos industriais (OZYILMAZ et al., 2015).

Buscando viabilizar os processos enzimáticos, pesquisas envolvendo a imobilização das enzimas têm sido realizadas nos mais variados campos de aplicação. O uso de enzimas imobilizadas em suportes sólidos possui muitas vantagens, dentre estas estão a fácil reciclagem e reutilização; elevadas áreas superficiais; estabilidade catalítica e operacional; fácil dispersão e, conseqüentemente, redução de custos (OZYILMAZ et al., 2015).

Em geral, os suportes usados são compostos de diferentes substâncias com características específicas à sua aplicação, existindo desde suportes sintetizados com polímeros até aqueles que são derivados de óxidos dos mais variados elementos químicos (metálicos e não metálicos). Dependendo do tipo de imobilização desejado, o suporte

usado terá que atender aos requisitos de afinidade pela enzima, capacidade de retenção da mesma, possibilidade de reutilização do mesmo suporte após ciclos de remoção da enzima desativada, natureza atóxica e baixo custo de produção.

Diferente do que ocorre em um sistema reacional empregando enzimas livres, no caso de reações com enzimas imobilizadas deve-se considerar que, além da reação catalisada pela enzima, há limitações relacionadas às características difusionais dos reagentes para a superfície do suporte contendo catalisador, a afinidade dos substratos e dos produtos pelos suportes enzimáticos e a estabilidade dos mesmos ao serem postos em contato com os meios reacionais. A imobilização de enzimas oferece várias vantagens sobre enzimas livres, incluindo a recuperação fácil, o potencial de operação contínua, o processamento posterior de forma simplificada e maior estabilidade. Esta técnica tem encontrado aplicações difundidas em muitos processos industriais. No entanto, quando as enzimas são usadas na forma imobilizada, a atividade da enzima pode ser dificultada pela limitação da difusão heterogênea sólido-líquido de substrato e/ou produto no meio reacional, especialmente quando o produto é um inibidor da reação (ELDIN e MITA, 2014).

Recentemente, o uso de nanopartículas com natureza magnética e paramagnética têm se mostrado promissor. As vantagens de um suporte desta natureza consistem principalmente na facilidade de recuperar o catalisador disperso no meio reacional através da aplicação de um campo magnético e conseqüentemente o seu reuso. Outro atrativo é a facilidade de síntese da magnetita, a qual é obtida utilizando sais ferrosos e férricos, e sua manipulação além de ser considerada segura é de fácil controle (MOTÉVALIZADEH et al., 2016; DURDUREANU-ANGHELUTA et al., 2014).

Devido as suas propriedades paramagnéticas (ou seja, torna-se magnético com a aplicação de um campo magnético), a aproximação de um ímã nas paredes do reator químico faz com que o catalisador seja recolhido permitindo a retirada do produto reacional sem qualquer outra operação unitária adicional de separação do catalisador dos produtos finais. Outro fator importante e vantajoso das nanopartículas magnéticas é a facilidade de orientação das proteínas/enzimas sobre os suportes. Em comparação com suportes poliméricos, tais nanopartículas não têm problemas de difusivos, tornando-as mais competitivas, especialmente para uso industrial em larga escala em sistemas sólido-líquido (por exemplo, a precipitação de proteínas) (XU et al., 2014).

Os suportes paramagnéticos, de modo geral, são compostos por uma base de partículas de óxidos de ferro como a magnetita (Fe_3O_4) e a maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), podendo conter também átomos de cobalto e níquel na sua composição. Porém, estas partículas por si só não possuem as características necessárias para imobilizar enzimas em sua superfície. Assim, o preparo destas partículas deve ser feito de modo a criar uma afinidade entre o núcleo magnético inorgânico e o catalisador orgânico a ser adsorvido. Dependendo do tipo de imobilização a ser realizada, o suporte tem um agente ligado a sua superfície que possibilite que a enzima seja fixada na sua superfície seja por interações físicas (por exemplo, a adsorção física) ou interações químicas (por exemplo, a imobilização por ligações covalentes).

Da mesma forma que o observado para o processo enzimático no todo, vale ressaltar que o suporte enzimático também deve ser produzido em condições viáveis para que sua aplicação seja ampliada na engenharia das reações enzimáticas.

Além dos clássicos sistemas núcleo/casca no qual o material magnético se situa no centro de uma partícula recoberta com um agente de superfície ativo (geralmente um derivado de silanóis), novos tipos de síntese de partículas magnéticas com grupos ativos ligados quimicamente ao núcleo de óxido de ferro têm sido desenvolvidos (DURDUREANU-ANGHELUTA et al., 2014; MALLAKPOUR e MADANI, 2015).

Paralelamente a isto, pesquisas envolvendo a síntese de nanopartículas, em especial de polímeros e compósitos, têm sido realizadas com o uso de ultrassom. A utilização destas ondas durante a síntese de nanopartículas tem sido usada para possibilitar maior efetividade das reações de síntese por promover a cavitação das microbolhas geradas durante a agitação dos reagentes, fazendo com que estes se misturem e reajam de maneira mais uniforme. Quando líquidos são irradiados com ondas de ultrassom, a sucessiva expansão e compressão das moléculas causada pelas ondas causa a formação de bolhas. Estas bolhas oscilam e vão ganhando um tamanho máximo (décimos de milímetros) até que entrem em colapso, ocorre em um processo rápido e em condições consideradas adiabáticas (SAFARIFARD e MORSALI, 2015).

Contudo, a síntese de nanopartículas de óxidos metálicos com características magnéticas com uso do ultrassom durante a reação de coprecipitação, até este momento, é um assunto pouco discutido nas pesquisas científicas. Diante dos resultados alcançados através do

emprego do ultrassom, é de se esperar que este também tenha influência na síntese das nanopartículas magnéticas. Uma vez que a ação das ondas de ultrassom irá interferir no momento de formação das partículas as quais deverão apresentar características como tamanho médio, carga superficial, área superficial entre outras, que difiram das mesmas sintetizadas sem o ultrassom.

O trabalho de LEE et al. (2009) descreve a síntese de nanopartículas de magnetita modificadas com lauril sulfato de sódio, porém, um dos maiores problemas encontrados está na baixa capacidade de adsorção do suporte desenvolvido em relação ao potencial de adsorção esperado. O radical lauril sulfato ligado à superfície da magnetita aumenta a sua característica hidrofóbica e permite que a parte apolar da enzima seja adsorvida fisicamente na cauda apolar do suporte fazendo com que seja de se esperar altos índices de imobilização.

Muitas são as aplicações das enzimas (imobilizadas ou não) nos processos industriais. Como exemplos de aplicação se tem a indústria alimentícia, farmacêutica, tratamento de efluentes ou indústria têxtil. Mais especificamente na indústria farmacêutica, na área de pesquisa de novos aditivos para cosméticos, os ácidos graxos livres e seus monoglicerídeos possuem atividade inibitória comprovada para uma variedade de microrganismos patogênicos, incluindo os vírus, bactérias gram-positivas e gram-negativas (NAIR et al., 2005). Além disso, são sintetizados utilizando matérias-primas de origem orgânica como o glicerol (produzido em abundância pela indústria do biodiesel) e os ácidos graxos de cadeia curta extraídos de gorduras como a de coco e a de babaçu (KNOTHE et al., 2006).

Até então, a síntese destes compostos têm sido estudada utilizando catalisadores químicos, mas a dificuldade operacional e a ampla variedade dos produtos reacionais formados inviabilizam o uso destes processos para a produção em larga escala. Tal fato motiva pesquisas que utilizem condições mais brandas e controladas para a síntese, condições as quais os catalisadores enzimáticos oferecem. Estes podem em um futuro próximo viabilizar em escala industrial a síntese desta classe de glicerídeos (WANG et al., 2013).

Em relação às sínteses utilizando enzimas e o emprego de ultrassom, os trabalhos se voltam à capacidade do ultrassom de acelerar reações químicas promovendo melhor mistura entre os reagentes e as enzimas e, por consequência disto, os rendimentos dos produtos reacionais são aumentados. A síntese e hidrólise de ésteres orgânicos utilizando lipases é citada na literatura como principal aplicação desta

técnica (ZENEVICZ et al., 2015; MARTINEZ-GUERRA e GUDE, 2015).

Dentro deste contexto, este trabalho tem como objetivo principal estudar a síntese e caracterização de suportes paramagnéticos em processo de coprecipitação de sais de ferro e lauril sulfato de sódio. O uso de banho de ultrassom é proposto com o objetivo de modificar propriedades físicas do suporte paramagnético para aumentar a capacidade de adsorção de lipases no mesmo e comprovar sua estabilidade e potencial de reuso. Após isto, foram realizados estudos de imobilização das lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica* tipo B e de aplicação destes na reação de esterificação de ácido caprílico com glicerol.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar nanopartículas paramagnéticas modificadas com lauril sulfato de sódio utilizando ultrassom, imobilizar as lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica* B nas nanopartículas sintetizadas e, como exemplo de aplicação, produzir ésteres de glicerol e ácido caprílico.

2.2 Objetivos específicos

- Estudar o efeito da aplicação de ultrassom e da frequência de agitação mecânica na síntese de nanopartículas de magnetita modificadas com lauril sulfato de sódio;

- Estudar a imobilização das lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica* B no suporte sintetizado, avaliando a influência da concentração inicial da lipase e o pH do meio;

- Ajustar os modelos de adsorção física das lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica* B às isotermas de adsorção de Langmuir e Freundlich;

- Avaliar o reuso das lipases imobilizadas através do uso de sucessivos ciclos de hidrólise e lavagem para testar a estabilidade destas nos processos enzimáticos;

- Avaliar a estabilidade térmica e a estabilidade das enzimas imobilizadas frente a solventes com diferentes polaridades;

- Estudar a aplicação das lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica* B imobilizadas na reação de esterificação do glicerol com ácido caprílico em diferentes condições experimentais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 LIPASES

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases) são uma classe de enzimas amplamente distribuídas entre os microrganismos, plantas e animais. A sua função natural é catalisar a hidrólise das ligações éster de glicerol, e, devido à reversibilidade da reação, a síntese de ésteres de glicerol também. A maioria das lipases é do tipo hidrolase-serina, ou seja, contém um resíduo de serina em seu sítio ativo, como o principal resíduo da tríade catalítica (Figura 1 a.) Ser – His – Asp (Glu) (ALCÁNTARA, FUENTES e SINISTERRA, 1998).

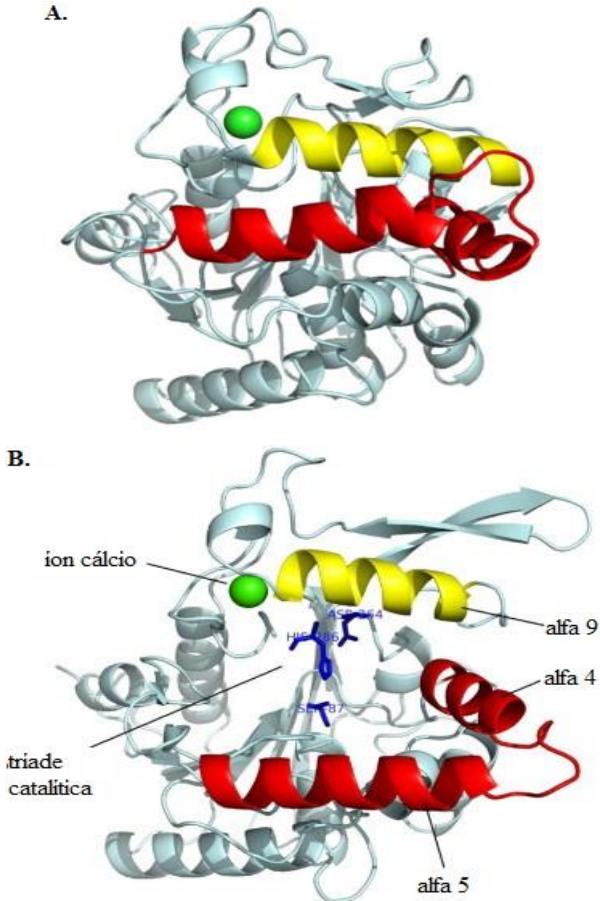
Os substratos naturais das lipases são os triacilgliceróis. Tendo estes baixíssima solubilidade em água, a hidrólise das ligações éster por catálise enzimática ocorre somente na interface entre a fase de substrato insolúvel, e a fase aquosa, na qual a enzima está dissolvida, o que reduz a conversão total alcançada pelo sistema e faz com que se busque novas alternativas para elevar os índices de conversão normalmente encontrados. No entanto, o potencial de aplicação das lipases neste segmento não é explorado o suficiente. Deste modo, a engenharia de reações enzimáticas é um assunto com amplo potencial de discussão que deve ser resolvido antes da sua aplicação em processos industriais (FREITAS et al., 2009).

Devido ao aumento acelerado na área de aplicação de síntese de moléculas orgânicas, a enzima mais extensivamente estudada na metodologia de imobilização é a lipase, uma vez que estando imobilizada, não deixa resíduos no produto final e pode ainda ser reutilizada. Por uma questão de necessidade, a investigação nesta área segue com a descoberta de novas enzimas mais eficientes e específicas, com possibilidade de síntese de novos compostos, bem como de novos suportes sólidos convenientes, capazes de sustentar a atividade da enzima em meios orgânicos com perda mínima de sua atividade. É bem conhecido que as lipases são enzimas interfacial-ativas com regiões hidrofóbicas. Em certos tipos de lipases, o movimento de um curto-circuito helicoidal é importante para detectar o sítio ativo (mecanismo de tampa (*lid*)) (NETTO, TOMA e ANDRADE, 2013).

Conforme demonstra a Figura 1, a tampa passa de fechada (conformação inativa) para aberta (conformação ativa) quando a enzima está exposta aos meios hidrofóbicos ou interfaces hidrofóbicas/hidrofílicas. Este fenômeno, conhecido como ativação

interfacial, é um mecanismo fundamental através do qual a maioria das lipases são ativadas (REIS et al., 2009).

Figura 1. A. Estrutura da lipase de *Burkholderia cepacia* em sua conformação fechada. B. Estrutura da lipase de *Burkholderia cepacia* em sua conformação aberta (com a tríade catalítica em destaque).



Fonte: HOUSAINDOKHT e MONHEMI, 2013.

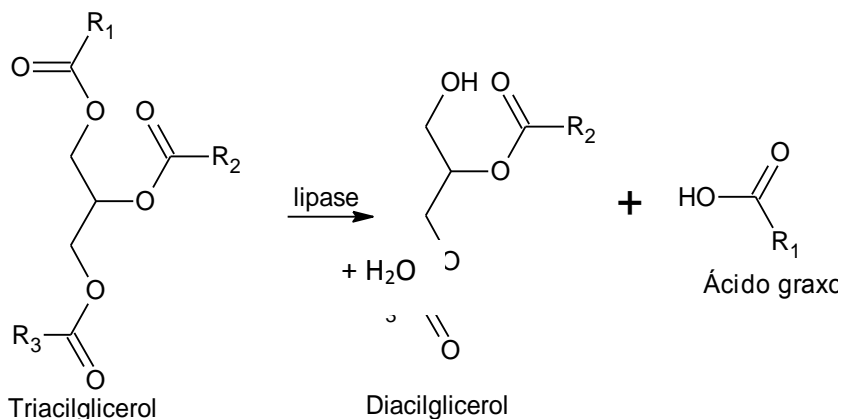
A especificidade das lipases utilizadas na produção de ésteres de modo geral refere-se à sua regioespecificidade e especificidade em

relação ao comprimento da cadeia de hidrocarbonetos de ácidos graxos. Em termos de regioespecificidade, as lipases foram divididas em três tipos:

- *sn*-1,3-específica (hidrolisa a ligação éster nas posições R₁ ou R₃ do TAG);
- *sn*-2-específicas (hidrolisa a ligação éster na posição R₂ do TAG); e,
- não-específicas (não fazem a distinção entre as posições do éster a ser clivado) (DORS, 2011).

A Figura 2 mostra a reação de hidrólise de um triacilglicerol formando um diacilglicerol e liberando uma molécula de ácido graxo:

Figura 2. Esquema geral da produção de diacilgliceróis através da hidrólise de triglicerídeos catalisada por lipases.



Fonte: RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010.

3.1.1 Lipase de *Rhizomucor miehei* (RM)

A lipase de *Rhizomucor miehei* é uma enzima comercialmente disponível em ambas as formas solúveis e imobilizadas com atividade muito alta e boa estabilidade em diversas condições experimentais (solventes orgânicos anidros, fluidos supercríticos, etc.) A utilização da enzima foi inicialmente orientada para a indústria alimentícia, encontrando uma ampla aplicação na área. Uma das características desta enzima é sua especificidade para os triglicerídeos que contêm ácidos graxos de baixo peso molecular (RODRIGUES e FERNANDEZ-

LAFUENTE, 2010). Comercialmente esta pode ser encontrada na forma livre ou imobilizada em suportes como o Duolite ES 562.

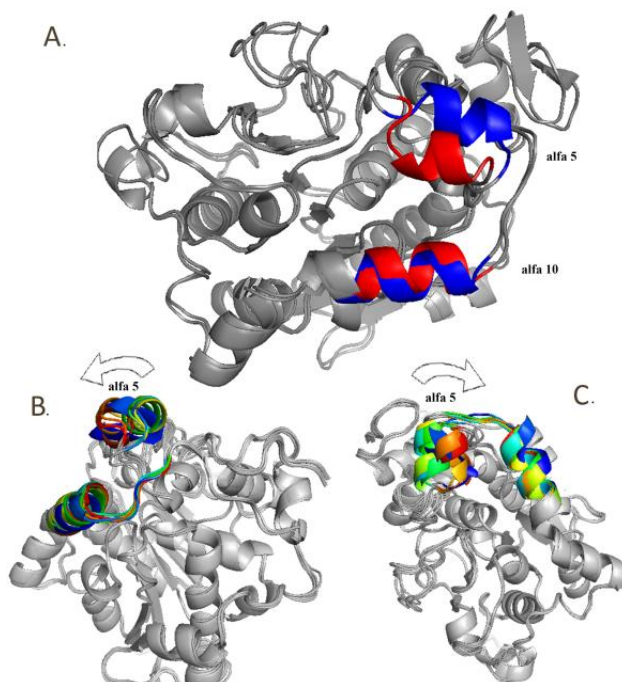
A hidrólise de triglicéridos é uma reação fundamental para a produção de ácidos graxos ou glicéridos. Embora a RM seja uma lipase específica sn-1-3, a migração espontânea do grupamento acil a partir da posição 2 para as posições 1 e 3 permite a hidrólise completa dos triglicéridos. Com as condições extremas de temperatura e pressão usadas na hidrólise química, ocorre a polimerização do óleo e a formação de produtos, resultando em um ácido graxo de cor escura. A hidrólise enzimática é uma boa alternativa para evitar estas desvantagens, a utilização de enzimas para a hidrólise não só forma produtos puros incolores, mas também reduz a formação de subprodutos, devido à especificidade da enzima. Em outros casos, o alvo da reação é a produção de di- ou monoglicéridos com uma composição específica de ácidos graxos ligados ao glicerol (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

3.1.2 Lipase de *Candida antarctica* B

A lipase de *Candida antarctica* B (CALB) (Figura 3) tem atraído muita atenção devido a sua alta estabilidade, estereosseletividade e enantiopreferência, propriedades que a torna superior a outras lipases em bioprocessos (JUNet al., 2013). A enzima é uma preparação de lipase de *Candida Antarctica B* produzida por fermentação submersa de uma linhagem de *Aspergillus* geneticamente modificada e imobilizada por adsorção em resina aniônica macroporosa (Lewatit® VP OC 1600, Bayer) (DORS, 2011), sendo esta uma das mais aplicadas e estudadas enzimas imobilizadas na produção de ésteres de glicerol e biodiesel.

A enzima é composta por 317 resíduos de aminoácidos, com uma estrutura clássica de dobras de α/β hidrolases, três pontes de dissulfeto e a tríade catalítica de sítio ativo (Ser 105, Asp 187 e His 224), sob uma tampa de potencial formação de hélice ($\alpha 5$). Dois modelos de conformações abertas e fechadas para a CALB foram descritos como modelo de estrutura (Figura 3), o que justifica a variação entre duas conformações distintas (GANJALIKHANY et al., 2012).

Figura 3. Representações da estrutura da CALB. Representações da estrutura de CALB com a conformação aberta (azul) e fechada (vermelho) (A.). Imagens de diferentes pontos de vista (B. e C.).

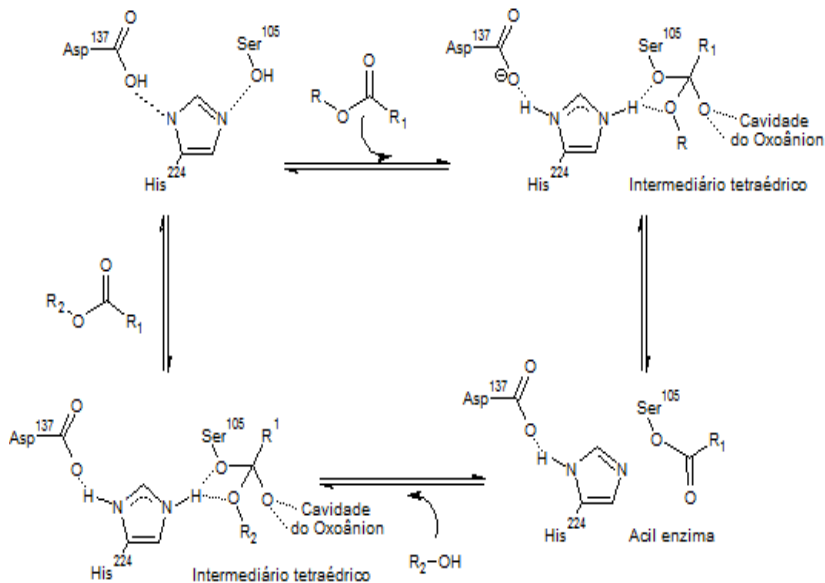


Fonte: GANJALIKHANY et al., 2012.

A flexibilidade da *lid* (tampa) da CALB a baixa temperatura é localizada na área do seu sítio ativo, ao passo que a estabilidade global da enzima não é significativamente afetada pela temperatura. Pode-se sugerir que as três ligações de dissulfeto ajudam na estabilidade geral da enzima para não ser desnaturada a ambas baixas e altas temperaturas. Pode concluir-se que a conformação fechada é resultado do movimento de $\alpha 5$, acompanhado pelo movimento das suas cadeias laterais diretamente para a fenda, na qual uma parte do sítio ativo é coberto por rearranjos estruturais. A abertura da tampa é essencialmente dependente da temperatura, enquanto que nenhuma força externa ou substrato ligado tiver sido aplicada. O mecanismo catalítico da CALB em seu sítio ativo

está apresentado na Figura 4 tanto para as reações de hidrólise quanto para esterificação sendo representados pela interação dos fragmentos de aminoácidos Ser – His – Asp com o substrato a reagir (GANJALIKHANY et al., 2012).

Figura 4. Mecanismo catalítico da CALB para hidrólise ou transesterificação.



Fonte: LI et al., 2010.

3.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Enzimas imobilizadas são enzimas que estão ligadas a, ou aprisionadas no interior de uma matriz de suporte macroscópica de modo que o catalisador resultante possa ser removido e reutilizado (BLANCH e CLARK, 1997). Em geral, a capacidade de reutilização é uma grande vantagem da enzima imobilizada impactando diretamente no custo do processo produtivo (LI et al., 2011).

Em contraste com os catalisadores convencionais, enzimas tendem à inativação ao longo do tempo. As condições de armazenamento e de processamento também podem afetar a sua estabilidade. É sempre complicado recuperar e reutilizar as enzimas após a aplicação em processos catalíticos. Assim, para realizar a recuperação e para aumentar a estabilidade térmica das enzimas, é

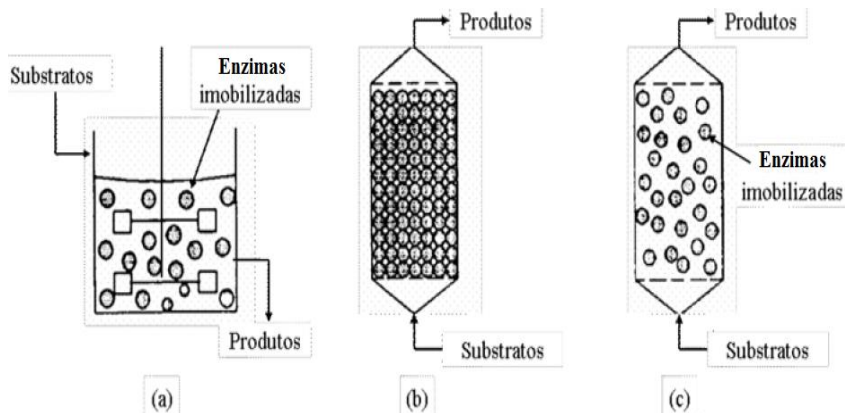
recomendada a imobilização destas em suportes suficientemente inertes que não sejam afetados pelo processo.

A imobilização é um processo em que a enzima é atraída para um suporte antes de ser usada em uma reação. A imobilização simplifica a separação de enzimas dos produtos de reação, facilita também as reações de catálise multienzimática simultânea e podem ser facilmente recuperadas para reuso, ao contrário de catálise empregando a enzima livre. As enzimas imobilizadas também possuem uma maior estabilidade térmica e prolongado tempo de vida em relação aos análogos não imobilizados (SWARNALATHA, ESTHER e DHAMODHARAN, 2013).

Do ponto de vista estrutural, a imobilização refere-se ao confinamento físico com a retenção das suas atividades catalíticas. Por conseguinte, uma vez que as enzimas são altamente sensíveis, a sua imobilização requer metodologias adequadas para a conservação ou eventualmente melhoria de suas propriedades, tais como estabilidade e atividade, aumentando, assim, a possibilidade de reutilização (NETTO, TOMA e ANDRADE, 2013).

As enzimas imobilizadas podem ser empregadas em ampla escala em diferentes configurações de reatores (Figura 5) e, pela alta concentração de catalisador que pode ser obtida, correspondentemente altas produtividades volumétricas são alcançadas. Altas produtividades em reatores levam a baixos custos de capital (BLANCH e CLARK, 1997).

Figura 5. Tipos de reatores para enzimas imobilizadas: (a) Reator de mistura; (b) Reator de leito empacotado; (c) reator de leito fluidizado.



Fonte: Adaptado de CANILHA, DE CARVALHO e SILVA, 2006.

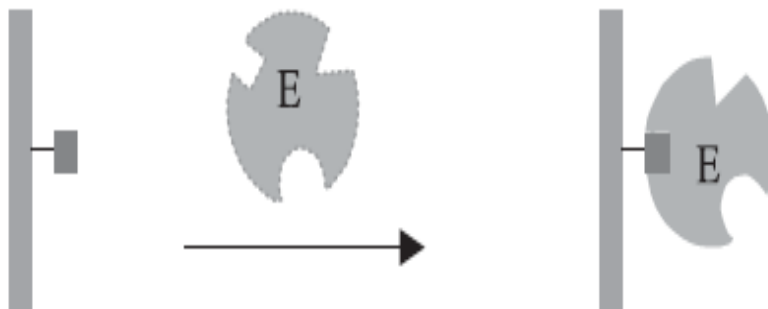
Apesar da grande diversidade de métodos desenvolvidos e aplicados na imobilização de enzimas, não há um método aplicável para todas as enzimas. Portanto, para cada aplicação de uma enzima imobilizada é necessário escolher o procedimento mais simples e mais barato e que resulte em um derivado com boa retenção de atividade e alta estabilidade operacional (MENDE Set al., 2011).

Diversos métodos são usados para a imobilização de enzimas, cada qual envolve um diferente grau de complexidade e eficiência. Dentre os quais os mais citados seguem descritos a seguir.

3.2.1 Adsorção física

É o método mais simples e envolve as interações reversíveis de superfície entre as enzimas e o suporte. A Figura 6 mostra um esquema da interação entre o suporte e a enzima por adsorção física. Entre as vantagens destacam-se as seguintes: é um processo barato, simples e rápido, não há alterações químicas necessárias para o suporte nem para a enzima, sendo este um processo reversível. As desvantagens são a dessorção da enzima a partir do suporte com os reusos, o possível impedimento estérico pelo suporte e a ligação não específica (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002). Por outro lado, a facilidade na remoção da enzima do suporte pode ser uma vantagem para a regeneração do catalisador, isto é, uma vez que a enzima imobilizada tenha sido desativada, esta poderá ser removida do suporte dando lugar a uma enzima ativa. Em condições otimizadas, este processo pode ser conduzido sem remover o suporte do interior do reator (BLANCH e CLARK, 1997). Podem ser usados suportes inorgânicos (carvão ativado, óxido de silício, carbonato de cálcio, óxidos metálicos, entre outros), ou compostos orgânicos (polímeros naturais ou sintéticos) (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

Figura 6. Imobilização por adsorção física de uma enzima em um suporte.



Fonte: CAO, 2005.

Usando um suporte hidrofóbico e força iônica muito baixa, as lipases ficam imobilizadas seletivamente nestes suportes pelas interações entre as partes hidrofóbicas da enzima e do suporte. A adsorção envolve as áreas hidrofóbicas que rodeiam o centro ativo e a face interna da tampa. Estas lipases adsorvidas apresentam uma forma aberta, com o centro ativo acessível para os substratos pequenos, o que de fato faz com que as enzimas imobilizadas geralmente exibam uma atividade aumentada significativamente (mecanismo de ativação interfacial). Em outras palavras, tem-se uma lipase imobilizada em que a forma aberta da lipase foi "fixada" e não depende da presença de interfaces externas hidrofóbicas (PALOMO et al., 2002).

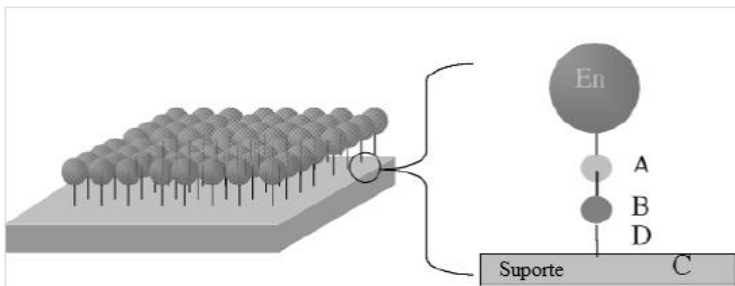
Outro tipo de adsorção de enzimas em suportes baseia-se em interações eletrostáticas entre os grupos iônicos carregados diferentemente da matriz e das enzimas (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002). A adsorção iônica é a mais fácil de executar e mais antigo protocolo geral para a imobilização reversível de enzimas (com regeneração do suporte) é a adsorção de enzimas em resinas de troca iônica (principalmente sobre as aniônicas). A imobilização de enzimas em resinas de permutação iônica convencionais frequentemente não é de forte intensidade e a maioria das proteínas são inteiramente dessorvidas a partir de tais matrizes em força iônica baixa moderada (por exemplo, 0,2 M de NaCl), ou se uma mudança de pH ocorrer durante a reação (PESELA et al., 2003).

3.2.2 Ligação covalente

Este método baseia-se na formação de ligações covalentes entre um material de suporte e alguns grupos funcionais dos resíduos de aminoácidos na superfície da enzima. Usualmente, o suporte tem de ser ativado em primeiro lugar por um reagente específico, para tornar os seus grupos funcionais fortemente eletrofilicos; estes grupos são, em seguida, reagidos com fortes grupos nucleofílicos da enzima. A vantagem deste método é a resistência da ligação e da consequente estabilidade de imobilização, as desvantagens são os custos mais elevados e os rendimentos mais baixos, tal como a conformação da enzima e, por consequência disto, a atividade será fortemente influenciada pela ligação covalente (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

Em geral, a ligação covalente de uma enzima com um suporte é baseada na reação química entre os resíduos de aminoácidos ativos localizados na superfície da enzima (A) e funcionalidades ativas que estão ligadas à superfície (B), ou vice-versa, tal como ilustrado na Figura 7. Para conseguir uma ligação eficiente, a funcionalidade do suporte e/ou a enzima deve ser ativada antes da imobilização através de tratamento com reagentes específicos os quais deixarão os grupos químicos a serem ligados com maior reatividade (CAO, 2005).

Figura 7. Imobilização covalente de enzimas sobre o suporte: (A) resíduo de aminoácido ativo, (B) a função de ligação do suporte, (C) suporte, (D) espaçador.

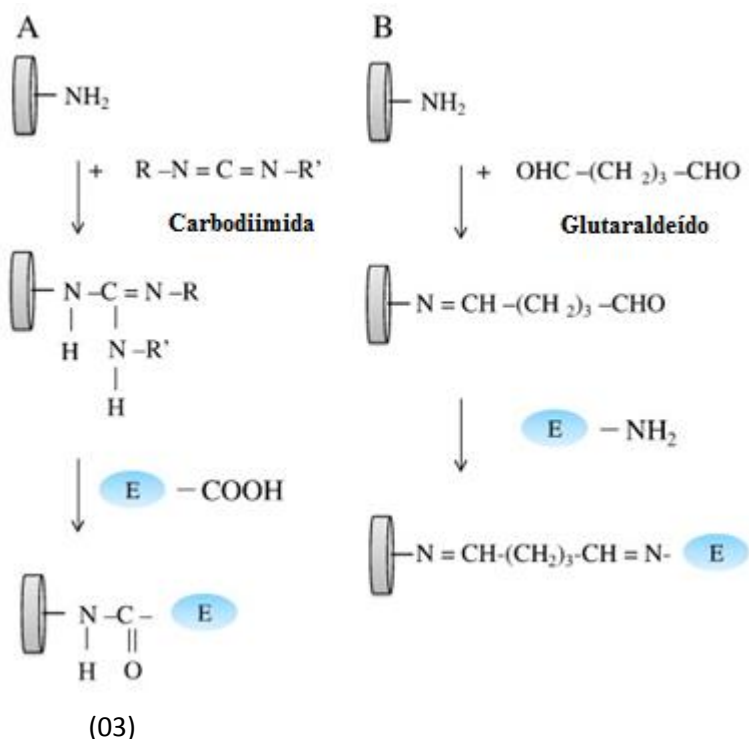


Fonte: CAO, 2005.

Por serem grupamentos de maior tamanho de cadeia, ascarbodiimidás e o glutaraldeído são os agentes mais amplamente

estudados como espaçadores entre as enzimas e o suporte. As carbodiimidias permitem a ligação entre os grupos amino de um suporte e a função carboxila da enzima. A imobilização de enzimas também pode ser conseguida usando glutaraldeído como agente de ativação. A primeira reação de base de Schiff ocorre entre um grupo aldeído de glutaraldeído e uma função amina de apoio. Em seguida, o segundo grupo aldeído de glutaraldeído reage com uma função amina da enzima conforme mostra a Figura 8 (SASSOLA Set al., 2012).

Figura 8. Imobilização de enzimas sobre superfícies aminadas por (A) carbodiimida ou (B) glutaraldeído.



Fonte: SASSOLAS et al, 2012.

A reação de redução das ligações duplas da base de Schiff formada, se realizada em condições estritamente controladas, não exercem efeitos deletérios sobre a estrutura das enzimas. Estas reduções constituem um ponto final bastante adequado para a preparação da

ligação covalente multipontual da enzima (amina) derivados de glutaraldeído (aldeído). Há uma gama muito ampla de condições experimentais (por exemplo, a partir de 1 mg.mL^{-1} borohidreto e 30 minutos de tempo de reação, as condições ótimas, modificadas para 2 mg.mL^{-1} de borohidreto e 120 minutos de tempo de redução) em que a redução da base de Schiff é muito intensa e os efeitos desnaturantes do borohidreto sobre a estrutura das enzimas são insignificantes ou muito brandos (BLANCO e GUISÁN, 1989).

Além dos grupos ativos requeridos nas enzimas para ocorrer a ligação covalente, é importante que o suporte tenha condições de oferecer ligantes compatíveis com os reagentes que se ligarão à enzima. No caso de suportes magnéticos, o núcleo magnético por si só não é susceptível a ligações do tipo covalente, porém este pode ser recoberto com um grupamento contendo silanóis puros ou modificados com grupos químicos amino os quais atribuirão propriedades desejáveis para a ligação covalente. O silanol hidrolisado forma uma película de óxido de silício hidratado contendo grupamentos $-\text{OH}$ ou $-\text{NH}_2$ ativos. Outra forma é a modificação do núcleo de Fe_3O_4 com o uso de agentes quelantes contendo grupos químicos ativos como os ácidos carboxílicos ou aminoácidos a este núcleo. Esta ligação entre o ferro e o composto orgânico é feita previamente à precipitação do núcleo magnético podendo então conter os grupos químicos susceptíveis a reações químicas de ligação com as enzimas.

3.2.3 Ligações cruzadas (*Cross-linking*)

Este tipo de imobilização é livre de suporte e envolve as enzimas juntando uma as outras para formar uma estrutura tridimensional. A ligação é formada por meio de reagente bi ou multifuncionais, tais como o glutaraldeído. As desvantagens são os baixos rendimentos de imobilização, a ausência de propriedades mecânicas e a baixa estabilidade (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

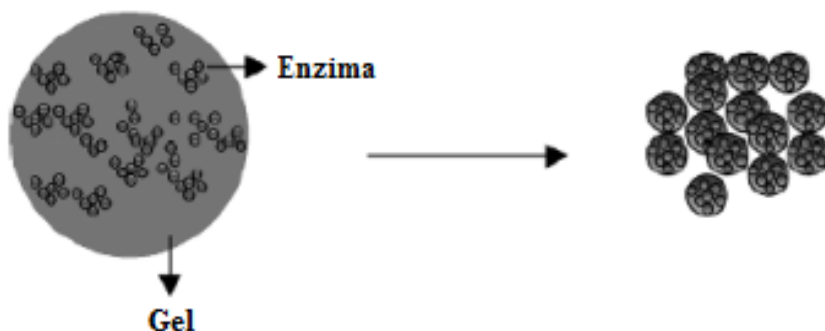
Os cristais de enzimas reticulados, ou CLECs, são formados por estruturas cristalizadas de uma enzima. Os agregados de enzimas reticulados, ou CLEAs, de um modo semelhante, são formados, forçando enzimas para agregar, por adição de sal ou solvente orgânico, seguido pela reticulação da estrutura. CLECs/CLEAs podem ser usados sozinhos como uma base enzimática insolúvel ou conjugado com um suporte (TALBERT e GODDARD, 2012).

Os CLEAs com propriedades magnéticas são normalmente preparados pela adição de aminoácidos funcionalizando nanopartículas de magnetita. Estes são misturados em seguida com a solução contendo enzima, ocorrendo a precipitação desta formando os agregados e, em seguida, ocorre a ligação cruzada de agregados de enzimas e nanopartículas (TALEKAR et al., 2012).

3.2.4 Encapsulamento em matriz sol-gel

Usando este método, a enzima é livre em solução, mas restrita ao movimento, pela estrutura reticular de um gel. Existem diferentes métodos para o encapsulamento, tais como a gelificação induzida pela temperatura, a polimerização por reação química/fotoquímica e a gelificação ionotrópica de macromoléculas com cátions multivalentes. O enclausuramento é usado principalmente para a imobilização de células, mas tem a desvantagem inevitável de que o suporte vai agir como uma barreira à transferência de massa (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002). A Figura 9 mostra um esquema simplificado do enclausuramento de um biocatalisador.

Figura 9. Encapsulamento de um biocatalisador.



Fonte: CAO, 2005.

Para conferir propriedades magnéticas às partículas encapsuladas, nanopartículas de magnetita são adicionadas durante a reação de geleificação.

A maioria das aplicações encontradas na literatura são voltadas à resolução de misturas racêmicas. Reetz et al. (1998) estudaram o encapsulamento da lipase de *Candida antarctica* em material do tipo sol-gel (com precursor de $\text{CH}_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$) hidrofóbico contendo

nanopartículas superparamagnéticas Fe_3O_4 (ou $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). O gel formado foi testado como um catalisador enantiosseletivo para resolução de compostos racêmicos na preparação da 2-pentilamina, utilizando acetato de etila como agente de acilação e com éter t-butilmetílico como o solvente. Foi possível manter aproximadamente constante uma enantiosseletividade de 97 – 99 %, valores semelhantes aos encontrados com géis semelhantes sem o emprego de partículas de magnetita (REETZ et al., 1998). Porém, o uso do magnetismo facilita a recuperação das partículas pós-reação química.

Estudos de resolução racêmica de intermediários da N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil) fenóxi] propan-1-amina (ou fluoxetina)(um antidepressivo), isto é, etil 3-hidroxi-3-fenilpropanoato alquil acilatos e 1-feniletanol alquil acetilatos usando suportes de sol-gel (usando tetraetilortossilicato e aminopropiltrióxissilano) por encapsulamento, ligação covalente e enclausuramento seguido por ligação covalente foram realizados. Todos demonstraram enantiosseletividade constante de 99 %, boa manutenção da atividade e enantiosseletividade por mais de 15 vezes de reuso e propriedades magnéticas que facilitam a separação do catalisador do meio reacional (CHAUBEY et al., 2009).

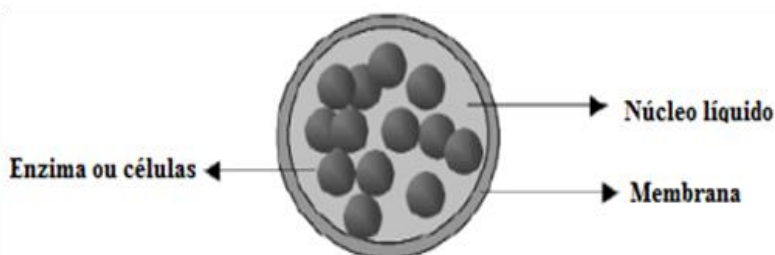
Uma base de sílica/ β -ciclodextrina foi imobilizada em nanopartículas de magnetita para se obter um composto macrocíclico com propriedades magnéticas, sendo em seguida lipases em matrizes de sol-gel, usando precursores alcóxi-silano. A atividade catalítica das lipases encapsuladas foi avaliada com reações modelo, ou seja, a hidrólise de p-nitrofenilpalmitato (p-NPP) e a hidrólise enantiosseletiva de éster metílico racêmico de Naproxeno (composto com atividade anti-inflamatória) que foi estudado num sistema de reação contendo solução tampão aquosa/isooctano sistema de reação tampão aquoso. Os resultados indicaram que a lipase encapsulada à base de ciclodextrina particularmente exibiu uma elevada conversão e o comportamento enantiosseletivo em comparação com a lipase livre (OZYILMAZ et al., 2014).

3.2.5 Encapsulamento em membranas

Outra forma de imobilização de biocatalisadores utiliza o encapsulamento de enzimas ou de células pelo envolvimento de componentes biológicos dentro de várias formas de membranas semipermeáveis, geralmente formando microcápsulas de 10-100 μm de diâmetro. A Figura 10 mostra a estrutura básica de biocatalisadores

encapsulados. Proteínas grandes não podem passar para fora ou para dentro da cápsula, mas pequenos substratos e produtos podem passar livremente através da membrana semipermeável. Uma desvantagem é o problema de difusão, uma vantagem pode ser a coimobilização das diferentes enzimas/células às aplicações particulares (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

Figura 10. Enzimas encapsuladas - definida como enzimas fisicamente delimitadas por uma membrana semi-permeável.



Fonte: CAO, 2005.

3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPARTÍCULAS PARAMAGNÉTICAS

A busca por suportes alternativos (diferentes das resinas comerciais normalmente utilizadas para imobilização de enzimas) tem motivado pesquisas para a aplicação de óxidos inorgânicos como matrizes para a imobilização das lipases (FORESTI et al., 2010).

Nas últimas décadas, os materiais em dimensões nanométricas foram surgindo de forma intensa e chegaram a uma importância elevada em todas as áreas da ciência e tecnologia (SWARNALATHA, ESTHER e DHAMODHARAN, 2013). Além do uso de zeólitas (VASCONCELLOS et al., 2012) e sílica mesoporosa (GUSTAFSSON et al., 2012) como suportes inorgânicos eficientes para imobilização de enzimas, óxidos como o de titânio (FORESTI et al., 2010), estanho (GUNCHEVA, DIMITROV e ZHIRYAKOVA, 2011) e cério (PANKYA et al., 2013) foram testados com sucesso como suportes, abrindo um novo ramo de aplicação de nanopartículas inorgânicas na imobilização de enzimas.

As partículas de magnetita (Fe_3O_4) e de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) são um dos nanomateriais magnéticos mais comumente usados. Estas

partículas exibem tamanho inferior a 30 nm, além do superparamagnetismo, um comportamento magnético que ocorre nos materiais compostos de um único domínio magnético. Como estas partículas são térmica, química e biologicamente estáveis, estas podem ser usadas com segurança em todos estes objetivos, e a separação magnética pode ser usada se uma enzima é imobilizada na sua superfície (SWARNALATHA, ESTHER e DHAMODHARAN, 2013).

Partículas superparamagnéticas são usadas em aplicações biomédicas de diagnóstico clínico e em aplicações *in vivo*, tais como agentes de contraste para obtenção de imagens por ressonância magnética. O termo "superparamagnetismo" não é muito preciso, mas é normalmente usado para enfatizar o comportamento magnético de partículas paramagnéticas (resultantes do acoplamento de vários milhares de átomos) em comparação com o paramagnetismo de um único átomo. A magnetização superparamagnética pode atingir quase a magnetização de saturação de óxido de ferro ferromagnéticos, mas em contraste com as partículas de ferro ferromagnéticos não mostram interações magnéticas após a eliminação do campo magnético. Além disso, o sistema operacional de magnetização de partículas superparamagnéticas segue um campo magnético externo sem histerese. As partículas podem ser monitoradas em um gradiente de campo magnético (útil, por exemplo, para o direcionamento de uma droga específica ao seu destino) e aquecida, este último baseado no relaxamento de Néel (por exemplo, por hipertermia fluido magnético na terapia do câncer de cérebro) (THÜNEMANN et al., 2006).

Além dos materiais magnéticos explorados até agora, espinélios ferríticos do tipo MFe_2O_4 ($M = Co, Mn, Ni$) estão emergindo como materiais promissores especialmente para aplicações biomédicas. Em comparação com os óxidos de ferro, estes espinélios ferríticos fornecem flexibilidade para controlar ambas as estruturas cristalinas e propriedades magnéticas, escolhendo diferentes metais não ferrosos em estruturas (MOHAPATRA, ROUT e PANDA, 2011).

Não basta somente o magnetismo exibido pelas partículas de Fe_3O_4 , para que estas apresentem aplicação no campo biotecnológico, é necessário que apresentem ligantes de superfície que permitam a união da partícula magnética com a enzima. Diversos materiais encontrados na literatura são empregados como agentes de superfície para as partículas de magnetita, tais como o ortossilicato de tetraetila (TEOS) e o 3-aminopropiltrimetóxisilano (APTMS), o ortossilicato de tetraetila e álcool polivinílico (PVA) (DORS, 2011), agentes silanizantes (LI,

CHURCH e WOODHEAD, 2012), o ácido glucônico (SUI et al., 2012) o qual apresenta alta hidrofiliçidade e biocompatibilidade e a goma arábica (SWARNALATHA, ESTHER e DHAMODHARAN, 2013).

Nos últimos anos, o uso de surfactantes, como o lauril sulfato de sódio, têm despertado interesse como ligantes para partículas de magnetita por seu baixo custo, estabilidade e a presença do grupo lauril disponível para interações hidrofóbicas entre a partícula e a parte apolar da enzima (QU et al., 2012, LEE, et al., 2008, TIE et al., 2006).

A síntese de um composto de coordenação entre o ferro e uma molécula de surfactante passa inicialmente pelo processo de quelação com oxalato de amônio (o qual possui elevada afinidade química com o íon ferroso) e precipitação do composto de coordenação na forma de magnetita através da elevação do pH. Em virtude do pequeno tamanho do ligante oxalato, o contato direto a superfície da magnetita com a enzima pode ser dificultado resultando em baixos rendimentos da imobilização. Para mitigar este problema pode se trabalhar com um espaçador maior entre o núcleo magnético e a enzima. O ânion lauril sulfato possui propriedades as quais estando ligado à magnetita faz com que esta contenha uma cauda apolar maior facilitando a imobilização de enzimas exclusivamente por interações hidrofóbicas (LEE et al., 2009).

3.4 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS COM O USO DE ULTRASSOM

A síntese sob ultrassom em fase líquida é um método eficaz que tem sido utilizado para preparar vários materiais com tamanho nanométrico. A irradiação de ondas de ultrassom causa a cavitação do líquido gerando "pontos quentes" com temperaturas efetivas de 5000 K, com altas pressões ocorrendo tudo isto na escala de tempo da ordem de alguns nanossegundos ou menos em ambiente micrométrico (a partir de 0,3 a 150 μm , dependendo da frequência de ultrassom usada). Quando as soluções são expostas a irradiação ultrassônica, bolhas em solução são implodidas por campos acústicos. O colapso da bolha durante a cavitação também pode induzir uma onda de choque na solução a qual conduz rapidamente a energia transmitida para o líquido em direção à superfície de partículas sólidas presentes (KUMAR, 2014). A cavitação ocorre em ambiente quase adiabático de microbolhas dentro de uma solução em condições ambientes Além disso, os efeitos físicos de cavitação ultrassônica (por exemplo, deformação mecânica, criação de

fluxos turbulentos e ondas de choque) pode alterar a morfologia e cristalinidade de sistemas coloidais em tratamento (RADZIUK, 2010).

O principal efeito da irradiação ultrassônica em reações químicas é de acelerar e iniciar novas reações que são difíceis de serem realizadas sob condições normais. As condições extremas obtidas durante o colapso de bolhas têm sido exploradas para preparar metais amorfos, ligas especiais, óxidos, carburetos, hidróxidos e sulfetos, e compósitos nanoparticulados (KIM, 2008).

São observados três fenômenos importantes para o efeito da irradiação ultrassônica: (1) o movimento rápido dos fluidos causados por uma variação de pressão provoca a compressão do solvente; (2) a cavitação; e (3) onde microfluxo contendo grande quantidade de energia vibratória é confinado em pequenos volumes de meio de reação (MARTINEZ-GUERRA e GUDE, 2015).

3.5 GLICEROL

O glicerol (propano-1,2,3-triol ou glicerina), um álcool trihidroxilado é um líquido claro, incolor, viscoso, de gosto doce e higroscópico a temperaturas ordinárias acima de seu ponto de fusão. As principais propriedades do glicerol estão descritas na Tabela 1.

O glicerol ocorre naturalmente em formas combinadas, como os glicerídeos, em todos os óleos graxos de animais e vegetais, e é recuperado como um coproduto, quando óleos ou gorduras são empregados no processo de manufatura de sabões, quando óleos ou gorduras são empregados na produção de ácidos graxos, ou quando óleos e gorduras são esterificados com álcoois para a produção de biodiesel (APPLEBY, 2006).

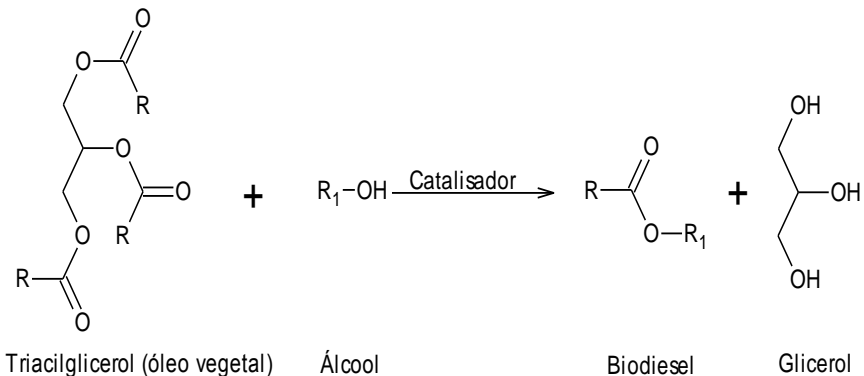
Tabela 1. Propriedades físicas do glicerol.

Propriedade	Valor
Ponto de fusão (°C)	18,17
Ponto de ebulição (°C)	
0,53 kPa	14,9
1,53 kPa	166,1
13,33 kPa	222,9
101,3 kPa	290
Massa específica, 25/25 °C	1,2620
Pressão de vapor (Pa)	
50 °C	0,33
100 °C	526
150 °C	573
200 °C	6100
Tensão superficial (2 °C, mN/m)	63,4
Viscosidade (20 °C, mPa.s)	1499
Calor de vaporização (kJ/mol)	
55 °C	88,12
95 °C	76,02
Calor de solubilização para uma diluição infinita (kJ/mol)	5,778
Calor de formação (kJ/mol)	667,8
Condutividade térmica [W/(m.K)]	0,28
Ponto de fulgor (°C)	
Copo aberto de Cleveland	177
Copo fechado de Pensky-Martens	199
Ponto de inflamação (°C)	204

Fonte: APPLEBY, 2006.

A Figura 11 mostra a principal rota de obtenção de glicerol, a reação de transesterificação de óleos ou gorduras.

Figura 11. A reação de transesterificação. R representa uma mistura de várias cadeias de ácidos graxos. O álcool empregado para a produção de biodiesel é geralmente o metanol ($R^1 = CH_3$).



Fonte: KNOTHE, 2006.

O glicerol bruto produzido pela transesterificação contém cerca de 80 % ou mais de glicerol. A qualidade da gordura afeta diretamente o tratamento exigido para produzir um glicerol com qualidade comercialmente aceitável. Os produtos químicos mais comumente usados para remover as impurezas são o ácido clorídrico e o hidróxido de sódio (APPLEBY, 2006).

3.6 SÍNTESE DE ÉSTERES DE GLICEROL

Os óleos e gorduras, tais como os derivados de sementes de plantas refinados, animais ou peixes, são compostos predominantemente de triacilgliceróis (TAG). Estes são geralmente considerados materiais fisicamente homogêneos, uma mistura molecular de TAGs contendo variadas combinações de ácidos graxos (CHEN, MCCLEMENTS e DECKER, 2014).

Estes TAGs são a maior fonte de ácidos graxos que são obtidos através da hidrólise e posterior fracionamento das frações ácidas. O processo mais comum de obtenção dos ácidos graxos é a hidrólise sob alta pressão em reator contínuo no qual uma corrente ascendente e contínua de gorduras flui em contracorrente a uma coluna de água mantida a 250-260 °C e 5 MPa. A gordura é separada pela água em ácidos graxos e glicerol. Os ácidos graxos são retirados pelo topo da coluna e o glicerol contido na fase aquosa decanta e é retirado pelo fundo (APPLEBY, 2006).

Dentre os TAGs naturais, o óleo de babaçu e a gordura de coco contêm consideráveis percentuais de ácidos caprílico (C8:0), ácido cáprico (C10:0) e ácido láurico (C12:0) conforme demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Principais ácidos graxos (% m/m) de óleos e gorduras utilizados e/ou testados como combustíveis diesel alternativo.

Óleo ou gordura

Composição de ácidos graxos (% m/m)

	8:0 ¹	10:0	12:0	14:0	16:0	18:0	18:1	18:2	18:3	22:1
Babaçu	2,6-7,3	1,2-7,6	40-45	11-27	5,2-11	1,8-7,4	9-20	1,4-6,6		
Canola					1,5-6	1-2,5	52-66,9	16,1-31	6,4-14,1	1-2
Coco	4,6-9,5	4,5-9,7	44-51	13-20,6	7,5-10,5	1-3,5	5-8,2	1,0-2,6	0-0,2	
Milho				0-0,3	7-16,5	1-3,3	20-43	39-62,5	0,5-1,5	
Algodão				0,6-1,5	21,4-26,4	2,1-5	14,7-21,7	46,7-58,2		
Linhaça					6-7	3,2-5	13-37	5-23	26-60	
Azeitona				0-1,3	7-20	0,5-5,0	55-84,5	3,5-21		
Palma				0,5-2,4	32-47,5	3,5-6,3	36-53	6-12		
Amendoim				0-0,5	6-14	1,9-6	36,4-67,1	13-43		0-0,3
Colza				0-1,5	1-6	0,5-3,5	8-60	9,5-23	1-13	5-64
Açafrão					5,8-8,0	1,9-2,9	8,4-23,1	67,8-83,2		
Açafrão, rico em ácido oleico					4-8	2,3-8	73,6-79	11-19		
Gergelim					7,2-9,2	5,8-7,7	35-46	35-48		
Soja					2,3-13,3	2,4-6	17,7-30,8	49-57,1	2-10,5	0-0,3
Grassol					3,5-7,6	1,3-6,5	14-43	44-74		
Sebo (bovino)				2,1-6,9	25-37	9,5-34,2	14-50	26-50		

¹ A notação indica a quantidade de carbonos por molécula de ácido graxo seguida pela quantidade de insaturações nesta cadeia. Por exemplo: C8:0 indica uma cadeia de oito carbonos em cadeia completamente saturada.

3.6.1 Monoacilgliceróis

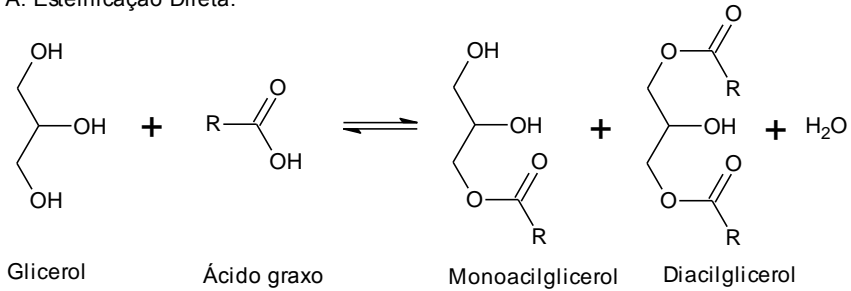
Monoacilgliceróis são os ésteres de glicerol em que apenas um dos grupos hidroxil é esterificada com um ácido graxo de cadeia longa. Normalmente os isômeros na posição 1 e 3 são denominados α -monoacilgliceróis, enquanto que os isômeros na posição 2 são os β -monoacilgliceróis. Monoacilgliceróis são catabolizados em células animais pela ação de uma lipase com a formação de ácidos graxos livres e glicerol. Esta enzima é atualmente de considerável interesse biológico, uma vez que é altamente expressiva em células cancerosas agressivas em humanos e tumores primários. Monoacilgliceróis sofrem migração do grupo químico acil muito rapidamente, para formar uma mistura que contém mais do que 80 % do isômero na posição 1. Do ponto de vista tecnológico, monoacilgliceróis sintéticos são importantes componentes de detergentes comerciais, nas áreas de dosagem de medicamentos, na estabilização de emulsões e na cristalização de proteínas (CHRISTIE, 2013). Além das aplicações citadas, recentemente sido desenvolvido um novo tipo de biocombustível, o ecodiesel, que integra uma molécula de MAG com duas moléculas de ácido graxo através da metanólise do óleo de girassol utilizando catalisador heterogêneo de CaO (CALERO et al., 2014).

Entre as rotas para a obtenção de monoglicerídeos, as reações enzimáticas empregando glicerol em esterificações (glicerol e ácidos graxos) e glicerólises (glicerol e óleos vegetais) possuem relevância adicional no atual contexto de prioridades nacionais, em função do estímulo do governo brasileiro à produção de biodiesel, a qual tem este poliálcool como subproduto (FREITAS et al., 2009).

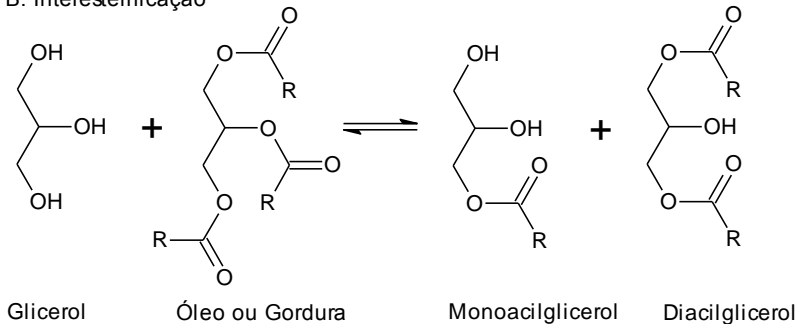
A Figura 12 apresenta as reações de produção de monoacilgliceróis mais amplamente estudadas, a esterificação direta e a interesterificação.

Figura 12. Reação de esterificação direta do glicerol (A) e interesterificação (B).

A. Esterificação Direta:



B. Interesterificação



Para interesterificação (glicerólise), gordura, glicerol e catalisador alcalino, tal como hidróxidos de cálcio são agitados a uma temperatura elevada (210 – 230 °C). Razões de glicerol/gordura mais elevadas requerem temperaturas de reação mais altas para deslocar o equilíbrio da reação no sentido dos produtos. Tal como acontece com a esterificação direta, o catalisador é neutralizado e o excesso de glicerol é removido. Uma vez que estas reações são realizadas em temperaturas elevadas, as reações secundárias podem produzir cores escuras e um sabor desagradável, que pode ser um problema em um produto alimentar acabado. O uso de uma atmosfera inerte, tal como o nitrogênio, no recipiente da reação reduz as reações secundárias oxidativas. O hidróxido de cálcio em 0,01 – 0,035 % proporciona um produto com boa cor. Um problema surge quando o catalisador é neutralizado com ácido fosfórico. O fosfato de cálcio é um precipitado fino que pode ser difícil de remover com alguns filtros antigos (HASENHUETTL e HARTEL, 2008).

Por causa da baixa solubilidade dos ácidos graxos no glicerol, frequentemente são utilizados sistemas bifásicos com agitação intensa (magnética ou mecânica) para homogeneização do sistema (SAKIYAMA et al., 2001). Devido à sua solubilidade limitada na fase de glicerol que contém uma pequena quantidade de água, a mistura reacional (sem solvente) consiste em duas fases. Após o tempo de incubação prescrito, os glicerídeos produzidos e os ácidos graxos remanescentes são extraídos a partir da mistura de reação com clorofórmio (SAKIYAMA et al., 2001).

Ainda segundo Sakiyama (2001b), em cada caso, a reação de síntese de MAG prossegue (em sistema bifásico sem solvente) a uma taxa constante durante cerca de 24 horas, e, em seguida, a velocidade da reação diminuiu gradualmente. A mistura de reação aproximadamente alcança um equilíbrio após 48 horas de reação. A existência de equilíbrio, provavelmente, é atribuída para a promoção da reação inversa, isto é, a hidrólise do monoglicerídeo, porque ocorre o aumento do conteúdo de água como o produto de reação de síntese.

A aplicação de peneiras moleculares do tamanho de 4 Å na proporção de 100 g.L⁻¹ para remoção da água produzida na reação de esterificação de um flavonoide duplicou o rendimento da reação em relação ao mesmo sistema operado somente com reagentes e solventes secos (GAYOT, SANTARELLI e COULON, 2003). Além disso, nas reações de produção de biodiesel, a quantidade de água produzida durante a reação se mostra um forte interferente no rendimento final reduzindo o teor de ésteres ao fim da reação. As zeólitas com tamanho de poro de 3 Å tem mostrado elevada eficiência na remoção de água durante o processo de esterificação de óleos vegetais com metanol ou etanol (ALBUQUERQUE et al., 2009).

Os produtos com concentrações de monoglicerídeo da ordem de 10 – 55 % podem ser produzidos por esterificação e interesterificação ajustando a proporção de glicerol/ácido graxo. Os MAGs podem ser ainda mais purificados por destilação produzindo um produto com concentração superior a 90 %. Os MAGs podem ser líquidos, sólidos ou semissólidos (HASENHUETTL e HARTEL, 2008).

Três monoacilgliceróis em específico tem atraído a atenção de pesquisadores devido a sua ampla aplicação como a monocaprilina (C8:0), monocaprina (C10:0) e monolaurina (C12:0).

A monocaprilina possui emprego em formulações farmacêuticas tópicas como um agente emulsificante para materiais lipofílicos, em concentrações de 5 – 10 %, e como um agente bacteriostático. O uso da

monocaprilina não apresenta riscos à saúde, dados indicam que este MAG em especial tem o potencial para ser um bom e bem tolerado veículo de penetração na pele de eficácia moderada (CORNWELL et al., 1998). Assim como a monocaprina e a monolaurina, este MAG é considerado um aditivo seguro inclusive para a indústria de alimentos (PARK et al., 2016).

Ainda no trabalho de Cornwell et al. (1998), foram estudados alguns excipientes de produtos farmacêuticos contendo misturas de ésteres de caprilato. Nestes casos, o comprimento da cadeia mais longa foi selecionado. No caso do polietileno-glicol-6 gliceril dicaprilato/caprato e poligliceril-3 diisoestearato, há muitas combinações, em que as várias cadeias laterais pode anexar ao glicerol/poliglicerol. A combinação para polietilenoglicol-6 gliceril dicaprilato/caprato foi escolhido arbitrariamente. Para poligliceril-3 diisoestearato assumiu-se que os grupos hidroxila em cada extremidade do poliglicerol seriam os locais mais prováveis para o posicionamento das cadeias laterais nos estudos com os estearatos.

Deve-se compreender, contudo, que a composição de tais excipientes óleo químicos pode mudar de um fornecedor para o outro, o que pode ter um impacto sobre a aplicabilidade geral dos resultados relatados até o momento. De todos os excipientes testados, apenas um, a monocaprilina, mostrou ter efeito de maior potencial de penetração na pele enquanto que os outros, por exemplo, o miristato isopropílico, não mostrou efeitos significativos de melhoria. Tal propriedade da monocaprilina é comparada a do propilenoglicol, sendo comumente encontrada em alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e outras aplicações que envolvem a possível ingestão ou absorção através da pele (MARTIN e MURPHY, 2006). A substituição de um derivado de petróleo (tal como o propilenoglicol), a propriedade bactericida e o uso do glicerol tem motivado o uso crescente da monocaprilina.

Emulsões de monocaprina em tampão a pH 4,1 são altamente eficazes para eliminar a *E. coli* e *Salmonella* em vários ambientes. Considerando-se o efeito de limpeza e desinfecção combinada de emulsões de monocaprina que pode ser útil como higienização de ambientes/instalações, cozinhas, e do próprio alimento. Para a redução da propagação de bactérias alimentares, tais como *E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*, emulsões monocaprina podem ser particularmente úteis, durante e logo após a manipulação de alimentos potencialmente contaminados em restaurantes e nas cantinas de escolas, hospitais e outros locais de trabalho (THORMAR e HILMARSSON, 2012).

Dentre os monoacilgliceróis mais estudados, a monolaurina é uma substância conhecida por ser atóxica aos seres humanos e eficaz contra muitos microrganismos. Derivada principalmente de produtos à base de gordura de coco, esta pode ser consumida em doses diárias consideráveis sem prejuízo ao seu potencial antiviral ou antibacteriano (DAYRIT, 2000).

O potencial antibacteriano, antiviral e antifúngico dos ácidos graxos de cadeia média presentes na gordura de coco, em particular o ácido láurico (C12:0) e na sua forma de monoglicerídeo têm resultados divulgados desde pesquisas realizadas na década de 70, as quais demonstraram inclusive efeito ativo no efeito de inibição do vírus HIV e consequente restauração dos níveis de células CD4 e CD8 em pacientes submetidos exclusivamente à terapia contendo monolaurina. O fato da atividade dos derivados da gordura de serem agentes inibidores para os organismos revestidos por lipídeos (bactérias gram-positivas, vírus encapsulados) sugere fortemente que ácidos graxos de cadeia curta tais como o caprílico, o cáprico e o láurico, exercem sua ação sobre a membrana plasmática lipídica dos microrganismos causando a desestabilização ou até mesmo causando a sua ruptura. Se este mecanismo for comprovado, a monocaprilina, a monocaprina e a monolaurina poderão ser usados sem sinergia com os antirretrovirais e inibidores da protease atualmente utilizados como agentes anti-HIV (DAYRIT, 2000).

3.6.2 Diacilgliceróis

Os 1,3-diacilgliceróis (DAG) tem atraído crescente atenção como intermediários para a síntese de vários compostos com aplicações farmacêuticas. Devido ao seu teor menor na sua forma natural, a síntese de 1,3-DAG torna-se importante e estes derivados podem ser preparados tanto quimicamente como enzimaticamente através da glicerólise, alcoólise parcial e esterificação. Os processos mediados por enzima, normalmente realizadas com a lipase como um catalisador, foram encontrados como sendo superior aos métodos químicos convencionais, devido às suas condições de reação suaves, maior rendimento e conveniência processual (MENG et al., 2014).

O triacilglicerol (TAG) formado pela esterificação do glicerol nas posições 1,3 com ácido caprílico e na posição 2 com ácido docosaheptaenóico (DHA) é um produto destinado a ser usado como um aditivo para o leite em pó para crianças prematuras, devido à sua

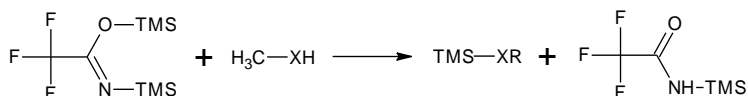
importância no desenvolvimento do sistema nervoso central (UAUY-DAGACH e VALENZUELA, 1996).

3.7 ANÁLISE QUANTITATIVA DOS ÉSTERES DE GLICEROL POR CROMATOGRAFIA

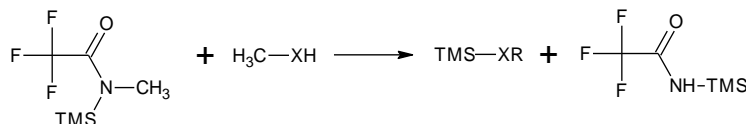
A cromatografia a gás (CG) tem sido o método mais utilizado para a análise de ésteres, em geral porque apresenta precisão elevada para a quantificação de componentes minoritários, tais como os MAG e DAG. Para a análise em CG, as amostras são tratadas com N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA)(FREEDMAN, KWOLEK e PRYDE, (1986), DESTAILLATS, CRUZ-HERNANDEZ, et al., (2010)) ou N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamida (MSTFA)(VOLL et al., 2011) para converter grupamentos hidroxílicos nos trimetilsilil derivados correspondentes conforme mostra a Figura 13. A preparação destes derivados é importante, porque melhora as propriedades cromatográficas de materiais hidroxilados. A elevada volatilidade do BSTFA, MSTFA e seus derivados resulta na separação de picos que eluem mais rapidamente em picos bem resolvidos (ORATA, 2012).

Figura 13. Reação de sililação para derivatização do glicérideo usando BSTFA (a) e MSTFA (b): TMS = Si(CH₃)₃, X = O, S, NH, NR', COO, R, R' = Alquil, Aril(ORATA, 2012).

A.



B.



As fases estacionárias mais empregadas nas análises por CG são as contendo 100 % de dimetilpolisiloxano ou contendo 5 % de fenilmetilpolisiloxano. O detector mais usado é o de ionização de chama (DIC) sendo empregado em alguns casos o acoplamento com um espectrômetro de massas (CG-EM) visando eliminar algumas ambiguidades sobre a natureza dos materiais eluentes (KNOTHE,

2006). A análise por GC-EM pode potencialmente permitir resolver regioisômeros de MAG e fornecer a identificação exata desses isômeros sem padrões disponíveis (DESTAILLATSet al., 2010).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) também tem sido aplicada na análise de ésteres de glicerol. Uma vantagem atribuída à CLAE, em comparação aos métodos de CG, está relacionada ao fato de que os procedimentos de derivatização demorados e dispendiosos não são geralmente necessários, o que pode reduzir o tempo de análise. Outra vantagem está na possibilidade de detecção de ésteres de ácidos graxos, ésteres de glicerol e resíduos de outras substâncias orgânicas na realização de apenas uma análise. Porém, a aplicação na análise de biodiesel e ésteres de glicerol não é tão comum como o emprego de métodos de CG (KNOTHE, 2006). Provavelmente, um dos motivos é o uso do arranjo de colunas e a necessidade de detectores específicos, além do uso de misturas de solventes que permitam a adequada eluição dos analitos. Tudo isto pode dificultar a montagem e estabilização da análise por CLAE.

3.8 ESTADO DA ARTE

A seguir serão demonstradas informações acerca das produções científicas relacionadas à síntese e aplicação de nanopartículas na biotecnologia. A Tabela 3 apresenta um resumo das principais aplicações encontradas para lipases imobilizadas em nanopartículas paramagnéticas.

De modo geral é possível observar que as aplicações são as mais amplas envolvendo desde substratos de baixa complexidade estrutural como os óleos vegetais e o glicerol até sínteses químicas mais avançadas e seletivas. É importante ressaltar que quanto mais elaborada for a nanopartícula paramagnética, maior será seu custo de produção. Este fator ainda é limitante na utilização destas como suportes para enzimas disponíveis comercialmente.

Porém, conforme pôde ser observado durante o levantamento de dados usados neste trabalho, a quantidade de pesquisas usando este tipo de suporte tem crescido substancialmente nos últimos anos.

Tabela 3. Principais ácidos graxos (% m/m) de óleos e gorduras utilizados e/ou testados como combustíveis diesel alternativo.

Nanopartículas	Enzima	Tipo de Imobilização	Aplicação	Referência
Composto de poligarskita e maguemita	<i>Candida sp. 99-125</i>	Adsorção física	Monitoramento da atividade hidrolítica usando azeite de oliva como substrato	LI et al., 2011
Magnetita (Fe ₃ O ₄)	<i>Aspergillus niger</i>	Adsorção física	Síntese de ácido ferúlico a partir de farelo de trigo	HE et al., 2015
Magnetita (Fe ₃ O ₄)	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Adsorção física	Estudo da regioselectividade da hidrólise de trioleína e óleos vegetais	AKIL et al., 2016
Magnetita e óxido de zinco recoberta com APTES	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Ligação covalente	Adição de grupos metileno à chalconas – Reação de Michael	GHASEMI et al., 2014
Magnetita recoberta com APTES	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Ligação covalente	Produção de biodiesel a partir de óleo de palma	RAITA et al., 2015
Magnetita recoberta com APTMS e anidrido succínico	Porcina pancreática	Ligação covalente	Ensaio de hidrólise de p-NPP e estabilidade	ZHU et al., 2014
Magnetita recoberta com cada lipase na forma de CLEAs	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>M. javanicus</i> , <i>Rhizopus niveus</i> , <i>Burkholderia cepacia</i>	Ligação covalente	Síntese de 1,3-diacilgliceróis de ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico, oleico e linoleico	MENG et al., 2011

Magnetita recoberta com polietilenamina	<i>Aspergillus niger</i>	Ligação covalente	Síntese de 4-hidroxometil-1,3-dioxolan-2-ona (carbonato de glicerila)	TUDORACHE et al., 2014
Magnetita recoberta com polietilenamina	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Adsorção física	Síntese de valerato de etila	KHOABI et al., 2015
Magnetita recoberta com filme de polidopamina	<i>Candida rugosa</i>	Adsorção física	Monitoramento da atividade hidrolítica usando tributirina como substrato	REN et al., 2011
Magnetita recoberta com TEOS e APTMS	<i>Bacillus licheniformis</i>	Adsorção física	Testes de estabilidade desta lipase frente a diferentes pHs, temperaturas, solventes, surfactantes entre outros agentes químicos	JAIN e MISHRA, 2015

De acordo com o demonstrado na Tabela 3, a maioria das referências consultadas utiliza o núcleo de magnetita recoberto com algum agente de superfície aplicado à imobilização de enzima. Este procedimento facilita a adsorção das mesmas, porém, dependendo da natureza do agente de recobrimento o processo pode se tornar oneroso desencorajando estudo que envolvam a ampliação de escala.

Com base no exposto se pode ver o potencial promissor das lipases aplicadas na síntese de substâncias em rotas sintéticas clássicas utilizariam condições mais enérgicas de reação, bem como gerariam mais subprodutos indesejados. Porém, como se sabe também, as lipases necessitam de procedimentos específicos para evitar sua desnaturação e por questões de viabilidade econômica os estudos envolvendo a imobilização das mesmas em suportes têm sido exaustivamente estudadas nos últimos anos visando o seu máximo reaproveitamento.

A utilização de nanopartículas de magnetita tem se mostrado um assunto promissor que também já possui uma série de estudos desenvolvidos. Porém, a utilização de agentes de superfície de alto custo não tem viabilizado o uso destas como suporte para lipases disponíveis no mercado. Vale ressaltar que na literatura investigada durante a realização da revisão, muito pouco foi encontrado sobre a modificação da nanopartículas de magnetita utilizando o mecanismo de coprecipitação de íons e em relação ao lauril sulfato de sódio, apenas um artigo faz uso de uma metodologia semelhante, porém, sem uso de ultrassom. Este trabalho irá apresentar os resultados do uso do ultrassom na síntese das nanopartículas, técnica que até o presente momento não foi apresentada em nenhum trabalho científico. Além disso, não foram encontrados estudos de caso envolvendo aplicações destas partículas na síntese de ésteres de glicerol como o estudo proposto neste trabalho.

Com isto, se busca nesta tese realizar estudos envolvendo a síntese de nanopartículas de magnetita usando um agente modificador de superfície de baixo custo como o lauril sulfato de sódio, sob ação do ultrassom, e a imobilização de lipases com diferentes características, bem como a aplicação deste produto na síntese de monoésteres de glicerol com ácido caprílico, visto que este se apresenta como um potencial substituto para o propilenoglicol e apresenta propriedades biocidas de valor apreciável. Desta forma, pretende-se caracterizar e estudar a viabilidade da síntese de um suporte com propriedades magnéticas de baixo custo, estável, com elevada afinidade por lipases e que permita a recuperação e reutilização de formas simplificadas na síntese de produtos de grande potencial de aplicação.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Lipases

A Tabela 4 apresenta as informações das lipases que foram utilizadas para o desenvolvimento da tese.

Tabela 4. Informações sobre as lipases usadas para o desenvolvimento deste trabalho.

Lipase	Origem	Forma	Suporte	Nome comercial	Fabricante
<i>Rhizomucor miehei</i>	Fungo	Líquida	-	Palatase 20000 U	Novozymes
<i>Rhizomucor miehei</i>	Fungo	Imobilizada	Duolite ES 562	Lipozyme RM IM	Novozymes
<i>Candida antarctica B</i>	Bactéria	Líquida	-	CALB	Novozymes
<i>Candida antarctica B</i>	Bactéria	Imobilizada	Lewatit® VP OC 1600	Novozym 435	Novozymes

4.1.2 Reagentes

Foram usados os reagentes sulfato de ferro II heptahidratado, sulfato de ferro III, oxalato de amônio dihidratado, hidróxido de amônio, lauril sulfato de sódio, ácido oleico, álcool etílico absoluto, isoctano, hidróxido de sódio, ácido fosfórico 85 %, corante azul brilhante de coomassie G-25, fenoltaleína, cloreto de sódio, p-nitrofenol, carbonato de sódio, glicerina, ácido caprílico, ácido acético, tetrahidrofurano, n-hexano, metanol, diclorometano, dimetilssulfóxido e terc-butanol, todos grau PA ou equivalente da marca Vetec. Os reagentes palmitato de p-nitrofenila, N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida, trimetilclorossilano, n-tetradecano, piridina, monocaprilina, dilaurina e tricaprilina, todos grau PA da marca Sigma Aldrich.

4.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES

4.2.1 Síntese dos suportes de magnetita funcionalizada com lauril sulfato

A metodologia para o preparo da magnetita com a superfície modificada pela presença de lauril sulfato foi realizada por coprecipitação de sais de ferro II e ferro III utilizando hidróxido de amônio como agente alcalinizante em banho de ultrassom. A seguir foi feita a substituição do oxalato por lauril sulfato utilizando lauril sulfato de sódio dissolvido e a pH 5. A preparação foi feita em duas etapas conforme descrição a seguir.

Na primeira etapa foi realizado o preparo das partículas de Fe_3O_4 contendo o ânion oxalato ligado quimicamente à sua superfície. Para tanto, hidróxido de amônio (28 % em massa) foi adicionado sob agitação mecânica a uma solução contendo os íons $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}:\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$ na razão molar de 2:1:0,1 a 75 °C até pH 9 formando suspensão de cor preta contendo as nanopartículas de magnetita, sendo este procedimento realizado em atmosfera de N_2 . O ânion oxalato foi usado como agente de quelação formando o complexo ferroso-oxalato, o qual permitirá a reação de substituição posterior pelo lauril sulfato de sódio. O aquecimento foi mantido por um período adicional de uma hora. Foi utilizado um banho ultrassônico durante todo o processo de síntese. Após o término do tempo de agitação, a suspensão foi decantada com o auxílio de um magneto colocado na parte inferior do béquer. Após completa decantação, as partículas foram lavadas com água destilada até que as águas de lavagem apresentassem pH neutro e não houvesse a formação de precipitado após a adição de algumas gotas de solução saturada de cloreto de cálcio, logo após, as partículas foram reservadas ao abrigo do ar para a etapa posterior de síntese.

Na segunda etapa, o ânion oxalato foi substituído pelo ânion lauril sulfato em solução de pH controlado. A substituição foi feita preparando-se uma suspensão de partículas de magnetita na solução de lauril sulfato de sódio selecionado em pH 5 (pH ajustado com solução de ácido clorídrico diluído) na razão molar de Fe_3O_4 :lauril sulfato de 2:1 igualmente em atmosfera de N_2 . A solução foi mantida sob agitação mecânica (800, 1200 e 1600 rpm) por 1 hora na temperatura de 75 °C. Após completa decantação, as nanopartículas foram lavadas com porções de água destilada (tratada previamente com corrente de N_2 para eliminação do O_2 dissolvido) até pH 7. Por fim, estas foram novamente

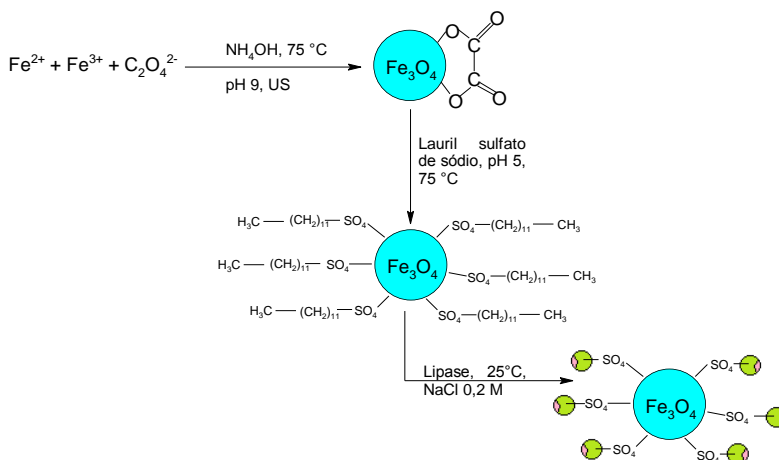
decantadas com auxílio de um magneto e secas em estufa a 40 °C até secagem completa.

As nanopartículas de magnetita contendo o ânion lauril sulfato foram igualmente sintetizadas, porém sem o uso do banho ultrassônico, para efeito de comparação do uso deste nas características do suporte finalizado.

A síntese da magnetita pura (Fe_3O_4) foi feita por coprecipitação de hidróxido de ferro II e III na proporção $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}$ de 2:1 a 75°C usando solução de hidróxido de sódio 2 M como agente alcalinizante do meio reacional.

A Figura 14 apresenta o esquema reacional de síntese do suporte utilizado nesta tese.

Figura 14. Esquema geral de síntese das nanopartículas de magnetita em banho de ultrassom modificadas com lauril sulfato de sódio.



Fonte: Autor.

Conforme demonstrado, a magnetita é sintetizada em duas etapas que favorecem a inserção do grupo lauril sulfato na superfície do suporte. A imobilização ocorrerá por adsorção física por interação entre o radical alquil do suporte e a parte hidrofóbica da enzima (representada neste esquema pela coloração verde das esferas) ocorrendo então a imobilização.

4.2.2 Difração de raios-X (DRX)

A difratometria de raios-X tem por objetivo investigar a presença de outras formas cristalinas de óxido de ferro possam ter sido eventualmente sintetizadas além da magnetita. O difratômetro utilizado para as análises foi o Philips X'Pert MPD, utilizando radiação α do cobre. As análises dos difratogramas foram realizadas com o auxílio do programa computacional X'Pert High Score Plus 2.2-Panalytical B.V., com o banco de dados JCPDS-ICDD e a base de dados ICSD.

4.2.3 Análise de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K

A adsorção (fisissorção) de N₂ a 77 K foi utilizada como técnica de caracterização de superfície dos suportes sintetizados. A análise de adsorção/dessorção de N₂ foi realizada no equipamento Autosorb-1, Quantachrome. O Autosorb-1 determina a quantidade de N₂ adsorvido à temperatura de 77 K e/ou dessorvido na superfície de um sólido, em condições de equilíbrio, pelo método volumétrico estático. O equipamento tem a capacidade de medir volumes adsorvidos ou dessorvidos de N₂ em pressões relativas com limite inferior de 1×10^{-6} (ANDERSEN, 2011).

4.2.4 Potencial zeta

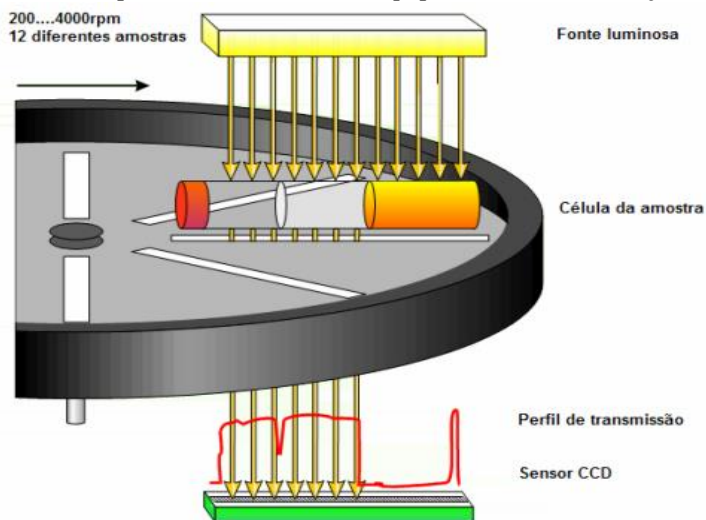
A medida do potencial zeta fornece informações sobre a carga superficial das nanopartículas sendo outra característica a ser considerada no que se deve determinar para avaliar se há carga disponível para ligações com outros materiais. Estas cargas mudam com a variação dos parâmetros experimentais e através deste potencial pode-se medir a magnitude das interações repulsivas entre partículas e avaliar a estabilidade destas em solução (NEVES, 2013). O potencial zeta de cada suporte sintetizado foi medido no equipamento Zetasizer Nano marca Malvern Instruments. Previamente à análise, as nanopartículas foram resuspensas em água destilada e diluídas até que não fosse perceptível a decantação das mesmas. A seguir, esta suspensão foi colocada em tubos de ensaio fechados e colocadas no banho ultrassônico por 15 minutos para então serem analisadas. A fim de verificar o potencial zeta do suporte sintetizado com banho de ultrassom em diferentes pHs foi feito um ensaio de variação deste, iniciando em pH 7,

sendo elevado até pH 11 e então reduzido até pH 3. O ensaio foi realizado no equipamento Stabino Particle Metrix.

4.2.5 Estabilidade de suspensão acelerada e tamanho médio de partículas

O estudo da estabilidade acelerada e da obtenção do tamanho médio das partículas foi realizado no equipamento de sedimentação modelo Lumisizer – L.U.M. Os resultados obtidos de um sistema óptico acoplado a uma centrífuga que trabalha em conjunto com um transmissor e um receptor de radiação na região do infravermelho próximo capaz de registrar espectros de transmissão ao longo da cubeta, conforme demonstrado na Figura 15 (MUNIZ, 2009). As suspensões de nanopartículas foram suspensas para cerca de 5 % em massa de sólidos totais para então serem colocadas na cubeta específica do equipamento com o auxílio de uma seringa e então colocada no carrossel para a realização da análise.

Figura 15. Princípio de funcionamento do equipamento de sedimentação.



Fonte: MUNIZ, 2009.

4.2.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Após a síntese das nanopartículas de NSM-OX e NSM-SDS com ação do ultrassom, estas foram lavadas e resuspensas em álcool etílico anidro para então serem gotejadas em um grid de parlódio e secas até remoção completa do solvente. A análise foi realizada em microscópio eletrônico de transmitância da marca JEOL, modelo JEM 1011 a 80 kV.

4.2.7 Magnetometria de amostra vibrante

O conhecimento das propriedades magnéticas dos suportes sintetizados tem por objetivo a consolidação destas para classificar este suporte como paramagnético comparando com as propriedades das substâncias puras. As propriedades magnéticas das partículas produzidas foram determinadas através de ensaios de magnetização da amostra vibrante (MAV). As análises foram realizadas em magnetômetro da marca Magmet Systems, modelo 3473-70 Electromagnet, operando com campos magnéticos entre -20 e 20 kOe.

4.3 IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES E CARACTERIZAÇÃO

4.3.1 Determinação de proteínas totais

A determinação do teor de proteínas nas enzimas estudadas foi realizada pelo método de Bradford (1976), o qual consiste no aumento da absorbância na região de 595 nm causada pela concentração de proteínas na solução de corante azul brilhante de Coomassie G-25. O reagente foi preparado conforme descrito a seguir.

O corante azul brilhante de Coomassie G-250 (100 mg) foi dissolvido em 100 mL de etanol a 50 % (v/v). A esta solução, foram adicionados 100 mL de 85 % (m/v) de ácido fosfórico concentrado. A solução resultante foi diluída para um volume final de 1 litro. As concentrações finais de reagente eram de 0,01 % (m/v) de Coomassie Brilliant Blue G-250, 4,7 % (m/v) de etanol, e 8,5 % (m/v) de ácido fosfórico (BRADFORD, 1976).

O ensaio foi realizado coletando alíquotas de 100 µL da amostra (isenta de partículas suspensas) dissolvendo em 5 mL do reagente de Bradford sendo a mistura acondicionada em tubo de ensaio com tampa. Os tubos foram agitados em agitador de tubos tipo vórtex e reservados por dois minutos até que a formação do complexo de complete para

então ser feita a leitura no espectrofotômetro usando como branco uma solução de 100 μL de água dissolvida em 5 mL do reagente de Bradford. A absorbância do complexo formado é anotada e a concentração real de proteínas dissolvidas obtida com o auxílio equação da curva de calibração utilizando albumina bovina em diferentes concentrações como solução padrão de proteína.

4.3.2 Ensaio de atividade hidrolítica

A atividade hidrolítica da lipase foi medida através da reação de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila (p-NPP), conforme método descrito no trabalho de Chiou e Wu (2004). A reação do p-NPP libera como produto o p-nitrofenol (p-NP), que absorve luz na região de 410 nm. Para esta reação, uma amostra de 200 mg do derivado enzimático foi adicionada à 1 mL de solução de p-NPP em etanol 0,5 % (m/v) e 1 mL de solução tampão fosfato 0,05 M (pH 7,0). Após incubação por 5 min a 30 °C, adicionou-se 2 mL de solução de carbonato de sódio 1 M, seguido por centrifugação durante 10 min a 3.500 rpm. A absorbância foi medida a 410 nm em um espectrofotômetro UV/VIS modelo U-2900 marca Hitachi. Uma unidade (U) de atividade enzimática de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1 μmol de p-NP por minuto sob as condições experimentais.

4.3.3 Ensaio de atividade de esterificação

A atividade de esterificação foi quantificada através do consumo de ácido oleico na reação de esterificação entre o etanol e o ácido oleico com razão molar álcool/ácido de 1:1, à temperatura de 45 °C. A reação foi realizada por 50 min iniciados a partir da adição do derivado enzimático (5 % m/m) ao meio reacional. A quantidade de ácido oleico consumido foi determinada por titulação com NaOH 0,2 M utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade de esterificação foi definida como a quantidade de enzima que conduz ao consumo de 1 μmol de ácido oleico por minuto nas condições experimentais descritas (AGUIEIRAS et al., 2011).

4.3.4 Isotermas de adsorção

A adsorção das lipases foi realizada em modo batelada em reator encamisado utilizando diferentes concentrações iniciais a pH fixo no valor 7,0. Os estudos de equilíbrio foram realizados colocando 20 mL de cada solução de lipase em contato com 0,2 gramas de suporte sintetizado e todo o conteúdo agitado com auxílio de um agitador mecânico com impelidor do tipo naval na rotação de 600 rpm e temperatura de 25 °C. Após duas horas de agitação, as nanopartículas foram decantadas com o auxílio de um magneto e foram coletadas alíquotas de 100 µL da solução para análise de proteínas em solução.

4.3.5 Imobilização das lipases e influência da concentração

Em 1 g de suporte foram adicionados 20 mL de solução de NaCl aquoso a 0,2 M, contendo a lipase solubilizada a diferentes concentrações. Por serem utilizadas lipases líquidas comerciais, foram misturados volumes fixos do preparado enzimático na solução de NaCl para então ser medida a real concentração enzimática. A mistura foi agitada mecanicamente a 600 rpm e 25 °C durante 24 h. Foram coletadas amostras nos tempos 0, 1, 2, 4, 6, 8 e 24 horas. Após este tempo, as partículas foram decantadas com auxílio de um magneto e lavadas com água destilada até o resíduo de lavagem não apresentar mais proteínas em solução. O tempo mínimo de reação necessário para a imobilização da enzima no suporte magnético funcionalizado foi determinado a partir do acompanhamento do decréscimo do teor de proteínas presente no sobrenadante. Para isto, foram coletadas alíquotas de 100 µL em determinados períodos de tempo e realizado a análise de proteínas remanescentes em solução.

O uso de variadas forças iônicas e a presença de um sal como o NaCl se justifica no fato que a primeira interação entre a enzima e o suporte será puramente hidrofóbica, o qual vai ao encontro com o escopo deste trabalho (RIOS, 2016; BARBOSA et al, 2013; BARBOSA et al., 2013). No trabalho de Barbosa et al. (2012) foram feitos ensaios com Triton e NaCl e ambos os reagentes alcançaram os resultados esperados na parte de adsorção física. Além disso, conforme descrito no trabalho de Pessela et al. (2005) quando enzimas são adsorvidas a concentrações mais elevadas de NaCl a força de adsorção foi em todos

os casos muito maior do que quando foi realizada sob a força iônica baixa habitual. Para esta etapa foram realizados ensaios em pH 7.

4.3.6 Influência do pH

Em 1 g de suporte foram adicionados 20 mL de solução de NaCl aquoso a 0,2 M, contendo a enzima solubilizada. O pH da solução foi corrigido com auxílio de soluções de ácido clorídrico ou hidróxido de sódio em água. Foram realizados ensaios em pH 5, 6, 7 e 8. A mistura foi agitada mecanicamente a 600 rpm e 25 °C sendo coletadas alíquotas de 100 µL (em triplicata) nos tempos 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 360 minutos. Após este tempo, as partículas foram decantadas com auxílio de um magneto e lavadas com água destilada até o resíduo de lavagem não apresentar mais proteínas dissolvidas. A análise de proteínas remanescentes em solução.

4.3.7 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier

Para identificação dos principais grupamentos funcionais bem como as ligações presentes nos compostos sintetizados, foram realizadas análises de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) em equipamento Perkin Elmer modelo FTIR 1760X. Cada amostra foi finamente moída, misturada com KBr espectroscópico seco na proporção de 1:300 mg, e prensada em uma pastilha com uma pressão de 12 toneladas durante 5 minutos sob vácuo. Os espectros de infravermelho foram obtidos com resolução de 1 cm⁻¹ entre 400 e 4000 cm⁻¹.

4.3.8 Análise termogravimétrica

Foram realizadas análises termogravimétricas para registrar as curvas de perda de massa (TG) para o conhecimento do perfil de perda mássica e a análise térmica diferencial (DTA) para o conhecimento do perfil térmico da amostra ao longo do aquecimento da amostra. A análise foi feita em analisador termogravimétrico modelo STA 443 F3 marca Netzsch. Os suportes com e sem enzima foram submetidos ao aquecimento em atmosfera de ar sintético em rampa de temperatura

ambiente até 900 °C com taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹ e vazão de gás de arraste de 100 mL.min⁻¹.

4.3.9 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

As partículas sintetizadas, após secas foram finamente pulverizadas e colocadas em porta amostras, sendo a seguir recobertas com película de uma liga de ouro/paládio e conservadas ao abrigo da umidade até a realização da análise. As análises de imagens por microscopia eletrônica (MEV-FEG) foram realizadas em equipamento da marca JEOL modelo JSM-6390LV.

4.3.10 Ensaio de estabilidade a solventes

O procedimento de estabilidade a solventes foi realizado através da incubação de 200 mg de lipase imobilizada em 10 mL de solvente a 25 °C por um período total de 24 horas. Após a mistura da lipase com o solvente foi feita uma agitação intensa e no decorrer do tempo total de contato foram feitas agitações ocasionais. A seguir o solvente foi retirado por decantação magnética das partículas e a atividade hidrolítica foi então ensaiada. O objetivo deste ensaio é o de verificar a influência do tipo de solvente na atividade da enzima imobilizada com vistas à aplicação desta em processos que necessitem de solventes para aumento do rendimento da reação. Os solventes utilizados foram ácido acético, diclorometano, dimetilsulfóxido, n-hexano, metanol, terc-butanol e tetrahydrofurano todos grau PA da marca Vetec.

4.3.11 Ensaio de estabilidade térmica

O procedimento de estabilidade térmica foi realizado adicionando-se 200 mg de lipase imobilizada a 10 mL de isoctano e a mistura foi agitada mecanicamente a 600 rpm em diferentes temperaturas (20, 40, 60 e 80 °C) por 2 horas, resfriadas à temperatura ambiente, retirando o isoctano por decantação magnética das partículas, secas em estufa a 40 °C e a atividade hidrolítica da lipase foi então ensaiada.

4.3.12 Teste de reuso

Para assegurar que além de ocorrer a recuperação do suporte se possa reutilizar as enzimas imobilizadas foram feitos testes de hidrólise. Uma quantidade de 200 mg de cada enzima imobilizada foi submetida a reações de hidrólise utilizando como substrato solução de p-NPP 0,5 % (m/v). Após a reação, o sobrenadante foi coletado para medir a quantidade de p-NP liberado e as partículas foram lavadas com porções de solução tampão fosfato 0,05 M e pH 7,0 até estarem livres dos substratos da reação anterior. Após isto foi iniciado mais um ensaio de hidrólise no mesmo tubo de ensaio para evitar perdas de enzimas imobilizadas entre uma etapa e outra da reação.

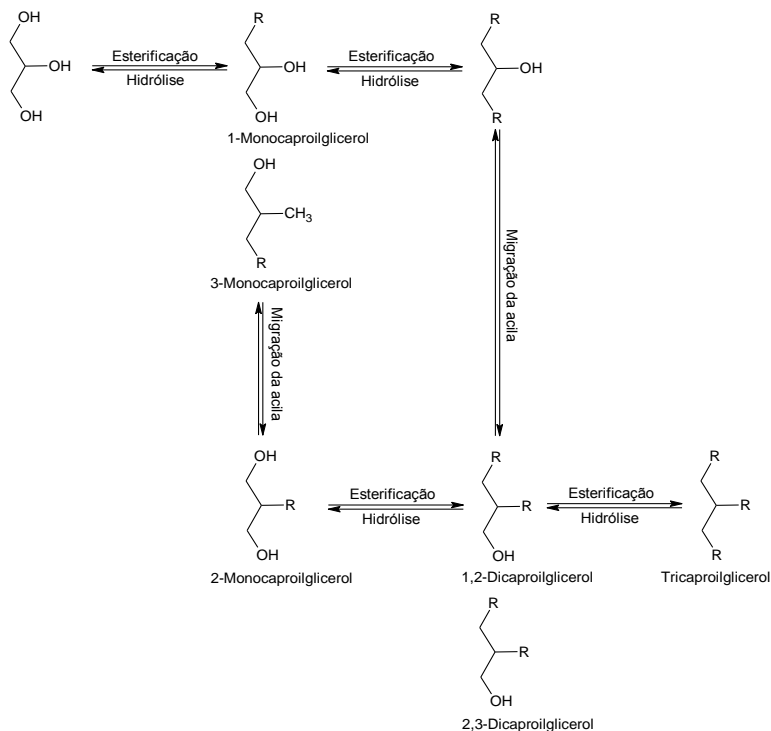
4.4 APLICAÇÃO DAS LIPASES IMOBILIZADAS

4.4.1 Esterificação do glicerol com ácido caprílico

Os ensaios de produção de ésteres de ácido caprílico com glicerol foram realizados em modo batelada em reator encamisado acoplado com agitador mecânico equipado com impelidor do tipo propeler. Foram variadas as razões molares de glicerol/ácido mantendo fixas a temperatura do meio reacional com o auxílio de um banho termostatizado a 60 °C, agitação constante a 800 rpm e tempo reacional de 3 horas. Foi mantida também a proporção de 5 % de enzima imobilizada no meio reacional. Foram testadas razões molares de glicerol/ácido de 6:1, 3:1, 1:1, 1:3 e 1:6. Ao final da reação, o conteúdo do reator foi transferido para um funil de decantação de 250 mL, suspenso com 50 mL de água destilada e a camada lipídica extraída com três porções de 30 mL de clorofórmio. A fase inferior contendo os produtos reacionais foi retirada e o clorofórmio completamente removido com o auxílio de um evaporador rotativo à vácuo. Após a retirada do clorofórmio o produto final foi recolhido e armazenado em vidro âmbar vedado e guardado em geladeira até a análise cromatográfica.

O esquema da reação e da migração de grupamentos acila está descrito na Figura 16 conforme adaptação do trabalho de Sanchez et al. (2014).

Figura 16. Esquema da reação de esterificação do glicerol com ácido caprílico.



Fonte: Adaptado de Sánchez et al., 2014.

As condições reacionais adotadas neste trabalho têm como objetivo o favorecimento da reação de esterificação formando o monocaproilglicerol.

4.4.2 Análises de Cromatografia a gás dos produtos de esterificação – Análise Quantitativa

Os ésteres de glicerol produzidos por esterificação enzimática foram identificados e caracterizados por cromatografia em fase gasosa, para a identificação do principal produto e principalmente na quantificação dos MAG, DAG e TAG produzidos com as enzimas imobilizadas. A metodologia de preparo das amostras e de análise por

cromatografia foi realizada de acordo com metodologia específica para análise de glicérides descrita nos métodos da AOCS (AOCS, 2003).

Previamente a análise a amostra foi derivatizada com N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) em reação catalisada por trimetilclorossilano (TMCS) conforme descrito a seguir. Foram pesados 10 mg de amostra em um tubo tipo Eppendorff de 2,5 mL, adicionados 0,1 mL de BSTFA, 0,05 mL de TMCS e 0,05 mL de solução 10 mg.mL⁻¹ de n-tetradecano em piridina como padrão de referência. Todo o procedimento foi realizado ao abrigo da umidade para evitar a hidrólise dos silanóis. O frasco foi fechado e agitado vigorosamente e colocado em banho termostático a 70 °C por cerca de 20 minutos. A amostra assim que preparada foi imediatamente analisada em um cromatógrafo a gás com detector por ionização de chama (FID), acoplado com uma coluna capilar apolar modelo DB5 (5 % de fenil metil polissiloxano), com as seguintes condições: temperatura inicial da coluna de 80 °C, taxa de aquecimento de 20 °C.min⁻¹ até 320 °C permanecendo nesta temperatura por 15 minutos. A temperatura do injetor foi de 320 °C e a do detector foi de 350 °C. A quantidade de amostra injetada foi de 2 µL com razão de *split* de 1:50. Foi usado hélio como gás de arraste na coluna a um fluxo de 2 mL.min⁻¹.

Os cromatogramas foram analisados e as áreas dos picos foram integradas através do software GC solution® Shimadzu.

4.4.3 Construção da curva de calibração

A construção da curva de calibração foi feita de acordo com método descrito por Fonseca (2015) baseado no método Cd 11b-91 da AOCS (AOCS, 2003) utilizando como padrões externos o ácido caprílico, monocaprilina, dilaurina (como referência para a dicaprilina) e tricaprilina.

As soluções de referência foram derivatizadas conforme descrito no item 4.4.2 com a adição de 50 µL da solução de padrão interno de n-tetradecano na concentração de 10 mg.mL⁻¹.

As curvas de calibração foram construídas conforme procedimento abaixo:

Durante o preparo da solução de referência para injeção, volumes conhecidos dos derivatizantes e da solução de padrão interno foram adicionados à solução de referência perfazendo um volume total V_{total} .

Assim tem-se que a concentração da substância de referência na solução injetada é dada pela Equação (01):

$$C_{SR}^I = \frac{m_{SR}}{V_{total}} \quad (01)$$

Onde:

C_{SR}^I : Concentração da substância de referência na solução injetada;

m_{SR} : Massa da substância de referência na solução de referência;

V_{total} : Volume total da solução de referência;

A Equação (01) também pode ser reescrita para expressar a concentração de padrão interno na solução injetada conforme a Equação (02):

$$C_{PI}^I = \frac{m_{PI}}{V_{total}} \quad (02)$$

Onde:

C_{PI}^I : Concentração do padrão interno na solução injetada;

m_{PI} : Massa do padrão interno na solução de referência;

V_{total} : Volume total da solução de referência;

Estabelecendo uma relação entre as Equações (01) e (02), obtém-se a Equação (03):

$$\frac{C_{SR}^I}{C_{PI}^I} = \frac{m_{SR}}{V_{total}} \times \frac{V_{total}}{m_{PI}} \quad (03)$$

Da simplificação da Equação (03) decorre a Equação (04)

$$\frac{C_{SR}^I}{C_{PI}^I} = \frac{m_{SR}}{m_{PI}} \quad (04)$$

Após integração das áreas dos picos dos cromatogramas das soluções de referência, as curvas de calibração foram construídas plotando-se a relação entre as massas de padrão interno e substância de referência versus a relação entre as áreas do padrão interno e da substância de referência conforme a Equação (05).

$$\frac{m_{SR}}{m_{PI}} = \alpha \frac{A_{SR}}{A_{PI}} \quad (05)$$

Onde:

m_{SR} : massa da substância de referência;

m_{PI} : massa do padrão interno;

A_{SR} : Área do pico correspondente à substância de referência;

A_{PI} : Área do pico correspondente ao padrão interno;

α : Coeficiente angular da curva (FONSECA, 2015).

5 RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS SUPORTES

O conhecimento das propriedades físicas medidas dos produtos de cada etapa reacional são de fundamental importância para a consolidação de uma técnica que esteja sendo desenvolvida. Embora a ideia do uso de nanopartículas de magnetita modificadas com lauril sulfato em sua superfície não esteja sendo divulgada pela primeira vez, o uso do banho ultrassônico é de caráter inédito. A ideia de utilizar as ondas do ultrassom na formação das nanopartículas se deve a uma observação feita durante a síntese destas sem este equipamento. Na síntese convencional não era possível a obtenção de partículas com propriedades uniformes, ou seja, os ensaios de imobilização e medidas de atividade não apresentaram qualquer repetibilidade variando consideravelmente entre uma batelada e outra de partículas, refletindo no potencial de imobilização das lipases. A partir do momento em que a síntese das nanopartículas começou a ser realizada com o auxílio do banho de ultrassom foi possível obtenção de todos os dados apresentados e discutidos nas seções a seguir.

Nas próximas seções serão demonstrados e discutidos os resultados das propriedades das partículas sintetizadas com e sem o banho ultrassônico em propriedades como área superficial segundo método BET, estabilidade da suspensão e tamanho de partícula por método de sedimentação acelerada.

5.1.1 Síntese do suporte de magnetita funcionalizada com lauril sulfato

O uso de condições de pH alcalino e temperatura acima de 70 °C em meio líquido com presença de oxigênio dissolvido favorecem a transformação parcial da magnetita em maguemita (SUN et al., 2004) além da formação de hematita (CHEN, 2013) sendo estes os eventuais contaminantes presentes no produto. Para assegurar que fossem sintetizadas somente partículas de magnetita sem a presença dos contaminantes supracitados, o sistema todo foi tratado com borbulhamento de nitrogênio gasoso durante todo o processo de preparo da magnetita contendo oxalato e previamente à funcionalização com lauril sulfato de sódio.

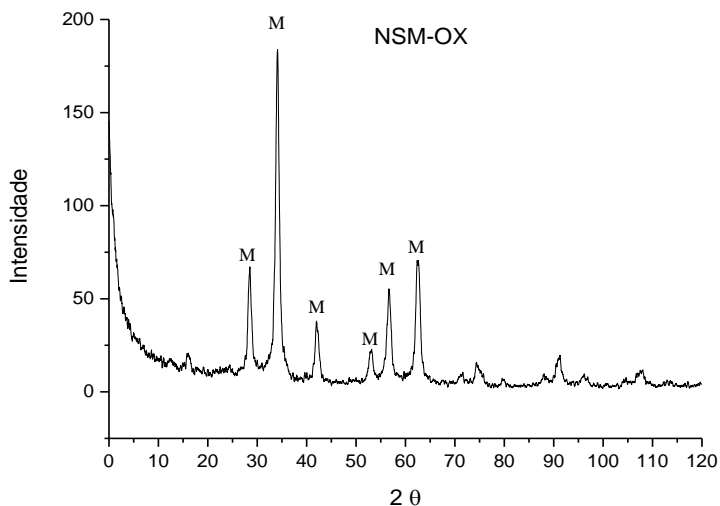
Com o objetivo de manter a ausência de oxigênio, o reator recebeu uma corrente de nitrogênio gasoso antes de ser fechado previamente à cada reação evitando o máximo possível a entrada do ar atmosférico. O controle de pH também é importante para evitar a formação de grupos químicos – OH (pH acima de 10) sobre a superfície das partículas, o que impediria a realização da etapa de ligação do agente de superfície proposto neste trabalho.

5.1.2 Difração de raios-X (DRX)

Como primeira etapa de caracterização dos suportes, foi feita a análise de difratometria de raios-X.

A Figura 17 apresenta o difratograma da amostra de magnetita modificada com oxalato (NSM-OX) sintetizada com uso do banho ultrassônico.

Figura 17. Difratograma de raios-X para a NSM-OX.



A amostra de NSM-OX foi preparada e guardada seca até a realização da análise. Os resultados se referem à análise feita em difratômetro de raios-X utilizando a radiação α do cobre. Os resultados foram tratados matematicamente através da suavização dos dados para

evitar o excesso de ruídos o que dificultaria a leitura e interpretação dos picos.

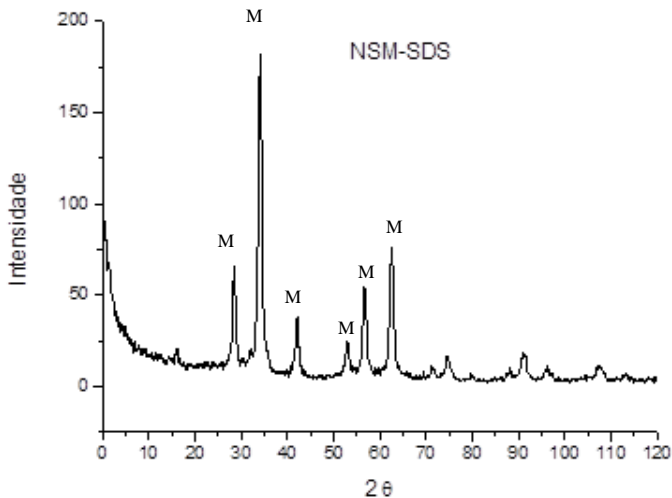
Segundo o banco de dados da JCPDS-ICDD, os seis principais picos característicos da magnetita estão nos ângulos $2\theta = 30,16^\circ$, $35,52^\circ$, $43,17^\circ$, $53,56^\circ$, $57,10^\circ$ e $62,70^\circ$ – todos indicados pela letra M no difratograma. O espectro de DRX confirmou a ausência de quaisquer impurezas na amostra (ICDD Arquivo N°. 85-1436). As posições dos picos nos valores 2θ correspondentes são indexadas como (220), (311), (400), (422), (511) e (440), respectivamente, os quais são consistentes com a base de dados de magnetita na JCPDS (GAO et al., 2015).

A observação descrita no parágrafo anterior confirma que a modificação da superfície de magnetita usando substâncias orgânicas como o oxalato de amônio não conduziu à formação de qualquer fase de cristal impuro correspondente à nanopartículas de hematita. Tal comportamento pode ser observado em outros trabalhos que descrevem a síntese de nanopartículas de magnetita com superfície modificada com moléculas orgânicas (SWARNALATHA et al., 2013; GAO et al., 2015; CHAICHI e EHSANI, 2016).

Caso houvesse algum resíduo de oxigênio dissolvido a magnetita produzida poderia ser convertida em hematita pela oxidação do ferro II a ferro III. A prévia eliminação deste dissolvido no meio reacional foi de fundamental importância antes da reação de coprecipitação da magnetita. Desta forma, ficou clara a influência deste procedimento uma vez que normalmente são encontrados traços de hematita em amostras sintetizadas sem este cuidado prévio.

A Figura 18 apresenta o difratograma da amostra de magnetita modificada com lauril sulfato de sódio (NSM-SDS) sintetizadas a partir da transformação das nanopartículas de NSM-OX.

Figura 18. Difratoograma de raios-X para a NSM-SDS.



A amostra de NSM-SDS foi preparada e guardada seca até a realização da análise. Os resultados se referem à análise feita em difratômetro de raios-X utilizando a radiação $K\alpha$ do cobre. Os resultados foram tratados matematicamente através da suavização dos dados para evitar o excesso de ruídos o que dificultaria a leitura e interpretação dos picos.

Da mesma forma que observado para as amostras de NSM-OX, não houve a formação de qualquer fase correspondente às partículas de hematita ou maguemita.

Outra característica importante está relacionada à observação da linha base do difratograma, o qual não apresenta significativa elevação da linha, indicando a estrutura em sua maior parte cristalina. A elevação da linha indica a presença de material amorfo.

Ainda de acordo com a JCPDS, todos os picos de difração identificados podem ser indexados como estrutura de espinélio exibida por Fe_3O_4 puro (Arquivo N°. 82-1533), indicando que as amostras exibiram um sistema cristalino cúbico de face centrada (ATACAN e ÖZACAR, 2015).

5.1.3 Análise de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K

A análise superficial e o volume dos poros das partículas NSM-OX e NSM-SDS sintetizadas com e sem o banho ultrassônico foram determinados pela metodologia de BET utilizando curvas de adsorção/dessorção de N₂ a 77 K.

A Tabela 5 mostra os resultados medidos de área superficial segundo método BET e o volume médio dos poros.

Tabela 5. Área superficial das partículas NSM-OX e NSM-SDS sintetizadas com e sem banho de ultrassom.

	Partícula	Área superficial (m².g⁻¹)	Volume dos poros (cm³.g⁻¹)
SEM	NSM-OX	91,77	24,40
ULTRASSOM	NSM-SDS	78,14	20,40
COM	NSM-OX	117,40	30,14
ULTRASSOM	NSM-SDS	149,30	38,57

O uso do banho ultrassônico para a síntese das partículas aumentou a área superficial de ambas as partículas e da mesma forma ocorreu com o volume dos poros. Quando não foi usado o banho ultrassônico houve inclusive uma redução na área superficial das partículas comprovando mais uma vez o efeito vantajoso da síntese destas partículas com o uso de ultrassom.

As Figuras 19 e 20 apresentam as curvas de adsorção de N₂ nas partículas sintetizadas.

Figura 19. Isoterma de adsorção de N_2 em nanopartículas de NSM-OX e NSM-OX US.

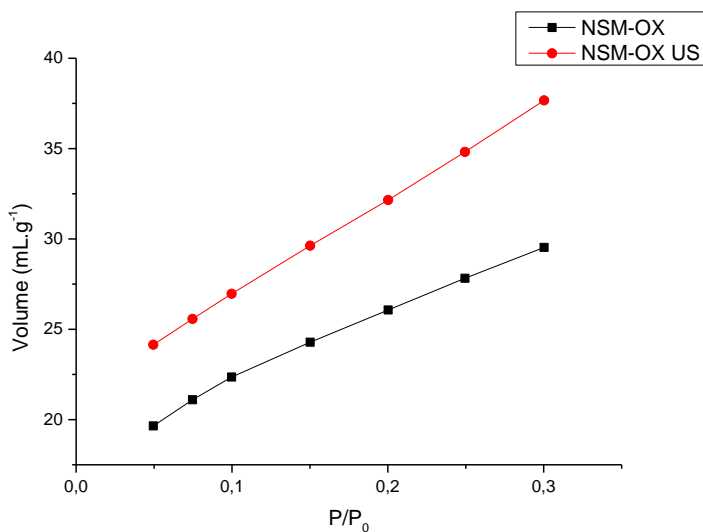
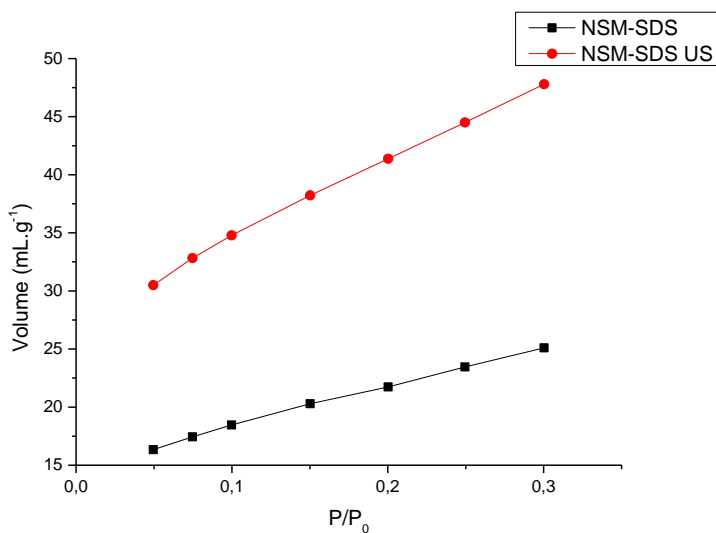


Figura 20. Isoterma de adsorção de N_2 em nanopartículas de NSM-SDS e NSM-SDS US.



De acordo com observações feitas com o comportamento das amostras analisadas e comparando com a classificação do processo de adsorção de acordo com a IUPAC, para todas as amostras o tipo de adsorção que mais se encaixam é a do tipo II. De acordo com Sing et al. (1985) em publicação oficial da IUPAC a isoterma do Tipo II é reversível, características de adsorvente (neste caso um suporte) não-poroso ou macroporoso. A isoterma do Tipo II representa a irrestrita adsorção em monocamada-multicamadas. Nesta isoterma, o início da seção linear da isoterma, muitas vezes é usada como referência para indicar a fase em que a cobertura monocamada é a adsorção completa e multicamadas prestes a começar.

5.1.4 Potencial Zeta

As características da carga superficial das partículas de NSM-OX e NSM-SDS foram estudadas através de curvas de potencial zeta analisadas por suspensão das partículas em água destilada e pH 7.

Em meio aquoso, as partículas de magnetita estão hidratadas e sua superfície encontra-se completamente coberta por grupos OH. Estes sítios hidroxilados podem dissociar liberando H^+ ou OH^- , deixando a superfície carregada negativa ou positivamente.

As medidas de potencial zeta foram realizadas a fim de determinar qual a estabilidade eletrostática das nanopartículas em suspensão. Elevados valores de potencial zeta indicam uma maior estabilidade da suspensão. Quando as partículas têm valores acima de +30mV ou abaixo de -30mV de potencial zeta elas tendem a repelir umas às outras caracterizando um sistema com suspensão estável.

A Tabela 6 apresenta os resultados das medidas do potencial zeta das partículas de NSM-OX sintetizadas em diferentes frequências de agitação mecânica com e sem a ação do banho ultrassônico.

Tabela 6. Potencial zeta das partículas de NSM-OX sintetizadas em diferentes condições experimentais.

SEM ULTRASSOM		COM ULTRASSOM	
Rotação (rpm)	ζ (mV)	Rotação (rpm)	ζ (mV)
800	-43,6	800	-6,31
1200	-48,6	1200	-4,54
1600	-22,9	1600	-29,1

A Tabela 7 apresenta os resultados das medidas do potencial zeta das partículas de NSM-SDS sintetizadas sob diferentes rotações com e sem a ação do banho ultrassônico.

Tabela 7. Potencial zeta das partículas de NSM-SDS sintetizadas sob diferentes condições experimentais.

SEM ULTRASSOM		COM ULTRASSOM	
Rotação (rpm)	ζ (mV)	Rotação (rpm)	ζ (mV)
800	-15,8	800	-20
1200	-11,7	1200	-12,4
1600	1,45	1600	-23,9

Um fator importante a ser considerado é a presença do lauril sulfato ligado às partículas. Pode-se perceber uma variação do potencial entre as amostras com e sem o lauril sulfato, sendo aquelas que possuem este radical são susceptíveis a aglomerar. Isso pode ser consequência direta do fato de que o lauril sulfato age como um inibidor de cargas superficiais existentes na magnetita, contribuindo assim para a redução da carga superficial.

De acordo com Schultz et al. (2008) com a diminuição do potencial zeta de um suporte, as forças de repulsão entre as partículas e uma enzima negativamente carregada (como é o caso das enzimas RM e CALB) resulta em um aumento da imobilização da proteína. A imobilização descrita nas próximas seções foi realizada com o suporte sintetizado em banho ultrassônico a 1200 rpm de rotação, por apresentar valor do potencial zeta em maior consonância com o discutido acima.

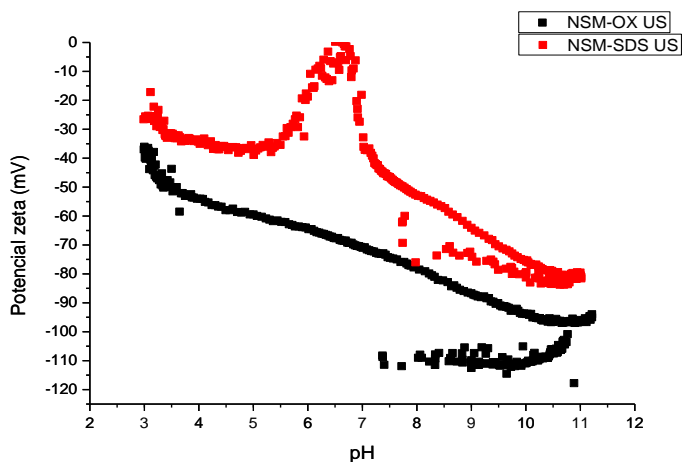
Após a imobilização das enzimas na nanopartícula de NSM-SDS sintetizada com ultrassom a 1200 rpm de agitação, os valores do potencial zeta medidos foram de -25 mV e -18,6 mV para as enzimas RM e CALB, respectivamente. Em comparação com os resultados medidos para o suporte (-12,4 mV) constatou-se a redução da carga superficial da partícula. Diferentemente do que ocorre em imobilizações com características iônicas, as quais a enzima neutraliza a carga superficial do suporte através da adsorção (ATACAN e ÖZACAR, 2015).

De acordo com o trabalho de Salgin et al. (2012), biomoléculas possuem valor do potencial zeta influenciado por diversas condições do meio reacional, dentre estas condições se pode citar a concentração de sais em solução, a influência do cátion em relação a sua valência e o efeito do ânion. Foi constatado que biomoléculas como enzimas em

geral apresentam potencial zeta negativo quando dissolvidas em solução de NaCl 0,2 M. Outros métodos poderiam trazer este potencial para mais próximo de zero ou até deixando com valor positivo, porém, quanto mais a próximo de zero estiver o valor do potencial zeta, maior será a probabilidade de interações do tipo proteína-proteína e menos interações do tipo proteína-suporte (OZYILMAZ, 2009), formando por consequência disto agregados (LEE et al., 2009) que não se imobilizam de forma estável sobre o suporte dificultando a investigação proposta por este trabalho.

O resultado do ensaio repetido com variação de pH e simultânea medida do potencial zeta no equipamento Stabino está descrito na Figura 21.

Figura 21. Comportamento do potencial zeta das partículas do suporte sintetizado com banho de ultrassom com variações de pH e simultânea medida do potencial.



Com o resultado deste ensaio se pode perceber a nítida diferença entre o comportamento da partícula de NSM-OX e NSM-SDS sintetizadas em banho de ultrassom. A partícula de NSM-SDS próxima ao pH sete apresentou valores de potencial zeta próximos a zero, ou seja, o seu ponto isoelétrico. Pode-se observar também que na curva de subida de pH de 7 para 11 e com posterior redução ao pH 3 não ocorreram as sobreposições das curvas. Tanto o ensaio inicialmente realizado exclusivamente em pH 7 quanto este realizado com pH variável não apresentaram estabilidade suficiente para apresentar uma

conclusão mais definitiva além de que estas partículas diferem e que a partícula de NSM-SDS de fato possui grande tendência de aglomerar se operarem como suportes.

Em pHs acima de 7,5 o zeta potencial diminui muito e nestas condições a imobilização das enzimas é desfavorecida. Não faz parte deste trabalho em específico estudar este comportamento. O objetivo se concentra na possibilidade de trabalhar no pH mais neutro possível para a adsorção de enzimas. Ensaio de variação de concentração do lauril sulfato de sódio na síntese do suporte bem como pesquisas sobre modificações da carga da enzima são estudos em desenvolvimento por outros membros do grupo de pesquisa. Para tanto o resultado apresentado é satisfatório para o objetivo delineado na parte inicial da tese.

5.1.5 Estabilidade de suspensão acelerada e tamanho médio de partículas

O efeito do uso de ultrassom combinado com diferentes rotações aplicadas na agitação mecânica foi investigado e como resposta foi analisado o tamanho médio das partículas e a estabilidade das suspensões feitas em meio aquoso. Foram sintetizadas as partículas de NSM-OX e NSM-SDS com e sem o uso de ultrassom sendo testadas as rotações do agitador de 800, 1200 e 1600 rpm.

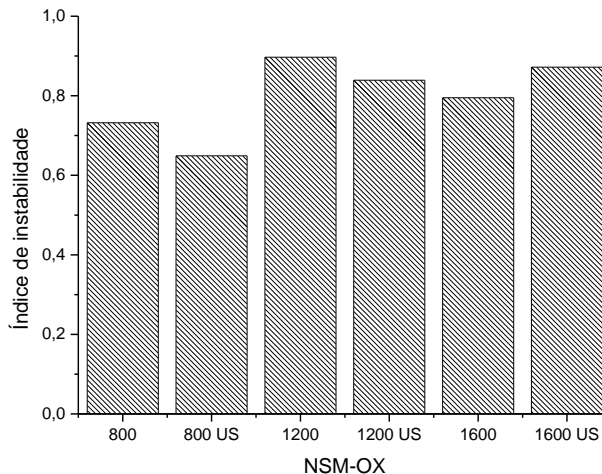
A Tabela 8 apresenta os resultados da medida do índice de instabilidade das suspensões de NSM-OX e NSM-SDS:

Tabela 8. Índice de instabilidade medidos por sedimentação acelerada das amostras de NSM-OX sintetizadas a 800, 1200 e 1600 rpm com e sem ultrassom (US).

	Condição reacionais	Índice de instabilidade
NSM-OX	800 rpm	0,732
	800 rpm e US	0,649
	1200 rpm	0,897
	1200 rpm e US	0,839
	1600 rpm	0,795
		0,872
NSM-SDS		1600 rpm e US
	800 rpm e US	800 rpm
	1200 rpm	0,331
	1200 rpm e US	0,235
	1600 rpm	0,932
	1600 rpm e US	0,614

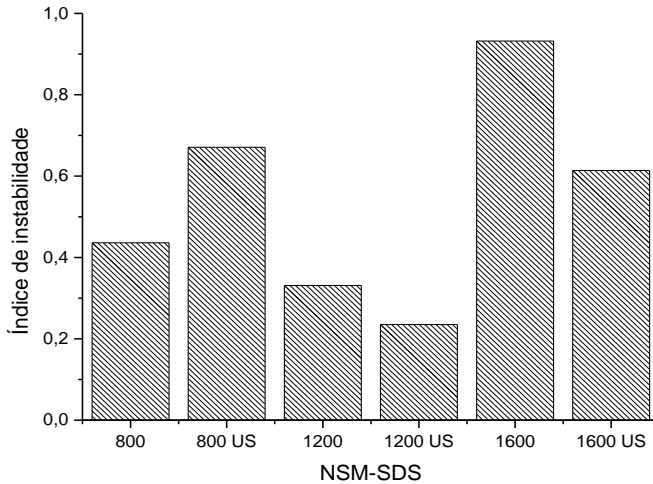
As Figuras 22 e 23 mostram os histogramas com os índices de instabilidade medidos por sedimentação acelerada das partículas sintetizadas em diferentes condições experimentais.

Figura 22. Índice de instabilidade das partículas de NSM-OX sintetizadas a 800, 1200 e 1600 rpm com e sem ultrassom.



Condições de preparo da amostra: Após a etapa de síntese, as partículas foram lavadas até que o pH da água estivesse neutro e foram conservadas em frasco vedado até o momento da análise. A suspensão a ser analisada por sedimentação acelerada foi preparada diluindo as partículas em água destilada até que a sua decantação não fosse detectada em um intervalo de no mínimo 15 minutos. Previamente à análise, esta suspensão foi agitada e colocada em banho ultrassônico para assegurar os resultados das medições.

Figura 23. Índice de instabilidade das partículas de NSM-SDS transformadas a partir das partículas de NSM-OX sintetizadas com e sem ultrassom e suspensas em água destilada.



Condições de preparo da amostra: Após a etapa de transformação das partículas de NSM-OX, as partículas de NSM-SDS foram lavadas até que o pH da água estivesse neutro e foram conservadas em frasco vedado até o momento da análise. A suspensão a ser analisada por sedimentação acelerada foi preparada diluindo as partículas em água destilada até que a sua decantação não fosse detectada em um intervalo de no mínimo 15 minutos. Previamente à análise, esta suspensão foi agitada e colocada em banho ultrassônico para assegurar os resultados das medições.

Através dos histogramas demonstrados é possível ver que para as partículas de NSM-OX o efeito do ultrassom e da agitação combinados não tiveram considerável impacto na estabilidade das suspensões, sendo que em algumas amostras o efeito do ultrassom elevou a instabilidade da suspensão (amostra 1600 US). Porém, no caso das amostras de NSM-SDS o efeito do ultrassom se mostrou nítido e as partículas sintetizadas a 1200 rpm foram as mais estáveis e tornou-se evidente o efeito do ultrassom, pois com a mesma agitação o uso do ultrassom diminuiu a instabilidade.

Com base nos dados obtidos através da sedimentação acelerada das amostras foi possível determinar o perfil com que a desestabilização ocorreu no interior das cubetas.

Ainda com a análise de sedimentação acelerada foi possível a determinação do tamanho de partículas das amostras sintetizadas nas condições citadas no início deste capítulo. A Tabela 9 mostra os

resultados do tamanho médio das partículas sintetizadas em diferentes condições experimentais:

Tabela 9. Tamanho médio das partículas medido por sedimentação acelerada das amostras de NSM-OX sintetizadas a 800, 1200 e 1600 rpm com e sem ultrassom (US).

	Condição reacionais	Tamanho médio de partícula (nm)
NSM-OX	800 rpm	98,87
	800 rpm e US	212,3
	1200 rpm	101,4
	1200 rpm e US	136,2
	1600 rpm	108,6
	1600 rpm e US	254,2
NSM-SDS	800 rpm	105,2
	800 rpm e US	218,9
	1200 rpm	131,2
	1200 rpm e US	333,3
	1600 rpm	110,4
	1600 rpm e US	134,7

De forma geral se pôde verificar um aumento no tamanho médio das partículas com a transformação destas de NSM-OX para NSM-SDS. Embora as partículas sejam sintetizadas para obtenção de tamanho médio de em torno de 20 nm, o que se pode observar é que praticamente todas as partículas sintetizadas apresentaram tamanho superior a 100 nm. Tal comportamento é descrito em vários trabalhos encontrados na literatura (BEDÊ, 2010; MASCOLO et al., 2013; WU et al., 2008; KHOEE et al., 2015), inclusive para partículas de magnetita sintetizada com agentes modificadores de superfície. Estes estudos enfatizam que muito embora as condições de síntese das nanopartículas sejam alcançadas, as mesmas tendem a formar aglomerados, os quais aumentam os valores do tamanho destas. De acordo com Mascolo et al. (2013) a formação dos aglomerados pode ser atribuída à interação magnetostática de partículas de magnetita ocorrida durante as etapas de separação magnética e/ou durante a lavagem e secagem das mesmas. Além disso, o tamanho de cada partícula individual é confirmado por MET, tal qual descrito na anteriormente.

Existem dois fatores a serem considerados para este elevado tamanho em relação ao esperado. O primeiro leva em conta a forma de lavagem e purificação das nanopartículas. Como não se dispunha de instrumentação específica para sedimentação completa das partículas, parte destas era perdida a cada ciclo de lavagem e decantação magnética, o que de fato irá aumentar o tamanho médio das que foram recuperadas. Outro fator consiste na continuidade da aglomeração das partículas ao longo do tempo, pois conforme dados da análise do potencial Zeta, as mesmas não possuem carga superficial que garantiria a repulsão entre as partículas. Esta aglomeração está relacionada à observação feita sobre o estado com que a suspensão se encontra, ou seja, floculada. Desta forma, é de se esperar que o tamanho destas partículas tenda a crescer se sua carga superficial não for ajustada para que então ocorra a repulsão e impeça o aumento do tamanho destas.

A análise de microscopia eletrônica de transmitância foi usada para melhor visualização destes aglomerados e com a identificação de mais características relacionadas à natureza nanométrica destas partículas.

5.1.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As Figuras 24 e 25 apresentam os resultados da análise de microscopia eletrônica de transmitância para as amostras sintetizadas.

Figura 24. Análise de superfície da nanopartículas de NSM-OX sintetizada com agitação mecânica a 1200 rpm e com uso de ultrassom.

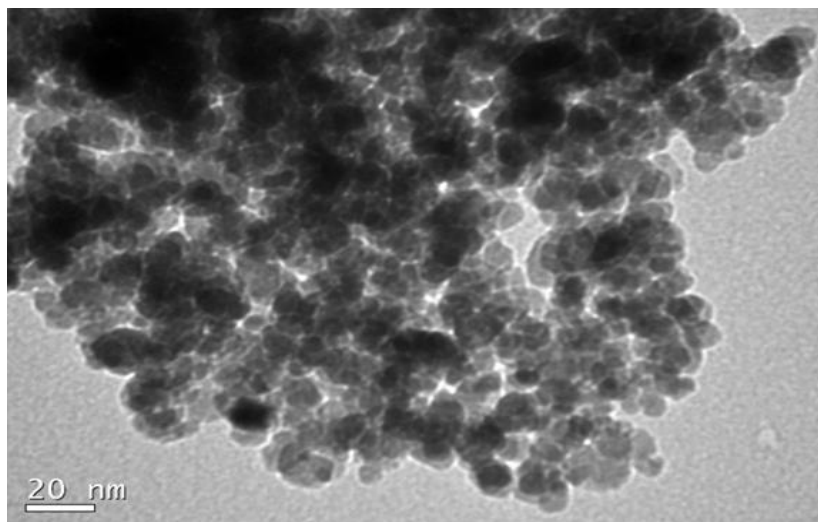
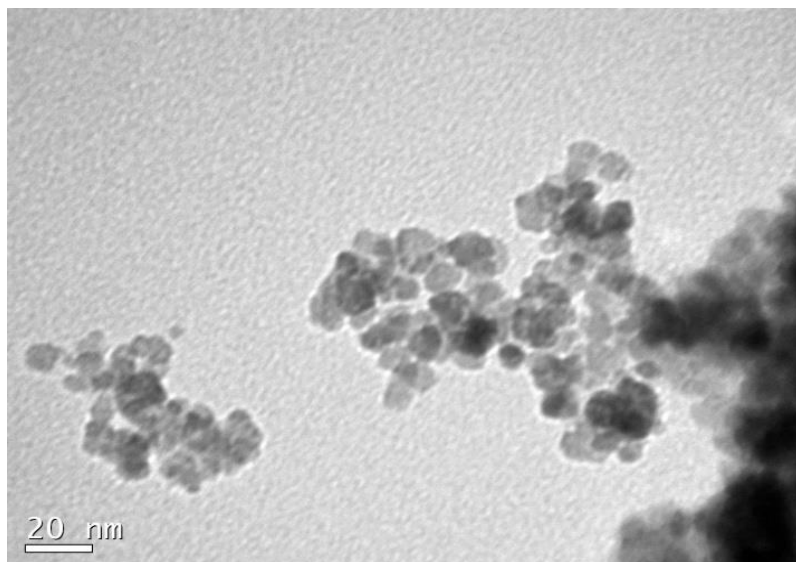


Figura 25. Análise de superfície da nanopartículas de NSM-SDS sintetizada com agitação mecânica a 1200 rpm e com uso de ultrassom.



Condições de preparo da amostra: Após a última lavagem com água destiladas, as nanopartículas foram suspensas em álcool etílico anidro na proporção de aproximadamente 1 % em massa e gotejadas sobre um grid de parlódio colocado sobre uma folha de papel filtro qualitativo. Foi aguardada a secagem completa da amostra para a realização da análise.

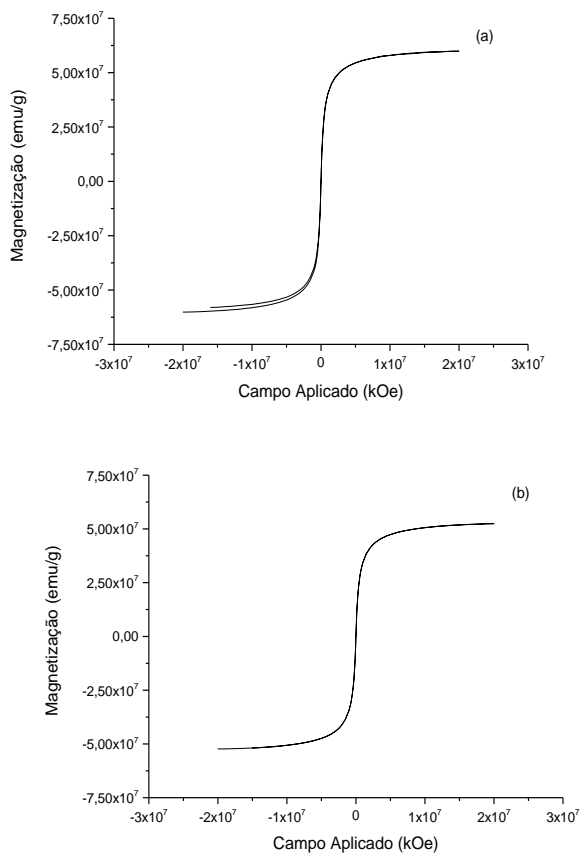
Conforme observado nas imagens acima, o tamanho de cada partícula, se isolada, situar-se-ia em torno de 10 nm caracterizando um material nanométrico conforme proposto no escopo deste trabalho. Porém, conforme pode ser visualizado nestas micrografias, o grau de aglomeração é elevado, sendo notado que as partículas de NSM-OX estão mais compactadas (evidenciado pelo sombreamento das imagens) que para a amostra de NSM-SDS. Conforme discutido anteriormente, a formação de aglomerados de tamanhos variados se justifica pela carga superficial medida na análise do potencial Zeta. Conforme demonstrado, as partículas de magnetita sintetizadas com agitação mecânica de 1200 rpm e aplicação de banho ultrassônico deixou estas com carga entre +/- 30 mV indicando a tendência de aglomeração das mesmas.

A formação destes aglomerados deve ser levada em conta no desenvolvimento deste tipo de suporte, pois em estudos de aumento de escala em reatores contínuos a heterogeneidade do suporte enzimático pode conduzir a efeitos negativos na passagem por um leito compactado com estas partículas.

5.1.7 Magnetometria de amostra vibrante

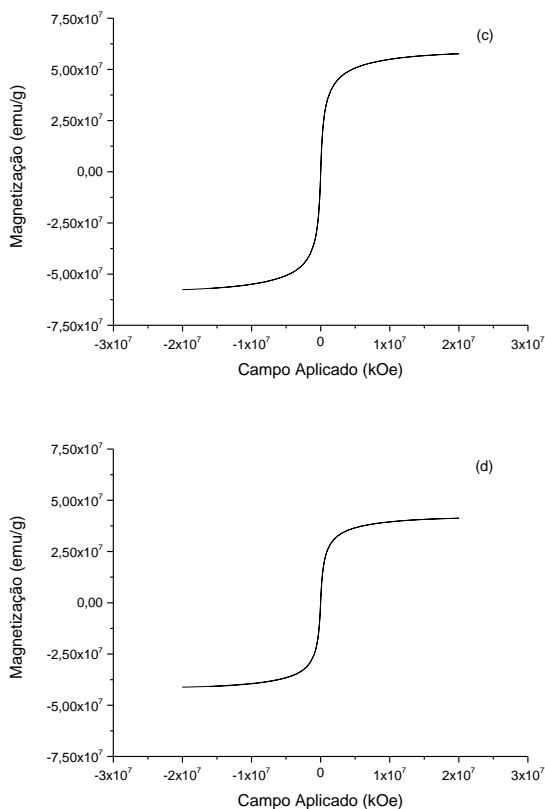
As propriedades magnéticas das partículas de NSM-OX e NSM-SDS sintetizadas com e sem o banho ultrassônico foram caracterizadas utilizando o magnetômetro de amostra vibrante (MAV). As curvas de magnetização para estas partículas foram registrados a 300 K. A Figura 26 apresenta as curvas de magnetização para as amostras de NSM-OX (a) e NSM-SDS (b) sintetizadas sem ultrassom.

Figura 26. Curvas de magnetização para as partículas de NSM-OX (a) e NSM-SDS (b) sintetizadas sem ultrassom.



A Figura 27 apresenta as curvas de magnetização para as amostras de NSM-OX (c) e NSM-SDS (d) sintetizadas com ultrassom.

Figura 27. Curvas de magnetização para as partículas de NSM-OX (c) e NSM-SDS (d) sintetizadas com ultrassom.



O comportamento observado nos gráficos das Figuras 29 e 30 confirma o comportamento paramagnético com partículas de tamanhos superiores a 10 nm (TEJA e KOH, 2009). De fato esta tendência se confirma comparando-se os resultados medidos por MET e pela análise do tamanho médio das partículas. Embora cada partícula isolada de magnetita tenha um tamanho aproximado de 10 nm, a carga superficial medida pela análise do potencial zeta (entre -30 e 30 mV) faz com que estas não tenham energia de repulsão suficiente e se aglomerem formando partículas que chegam a alcançar tamanhos superiores a 400 nm.

Os valores de magnetização e de coercividade das partículas estão apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Valores medidos de magnetização e de coercividade das partículas sintetizadas com e sem banho de ultrassom.

Amostra		Ms (emu/g)	Mr (emu/g)	Hc (kOe)
Sem ultrassom	NSM-OX	63,77	0,023	0,182
	NSM-SDS	52,40	0,026	0,237
Com ultrassom	NSM-OX	57,62	0,015	0,130
	NSM-SDS	41,20	0,013	0,163

Os valores baixos de Hc e Mr indicam um comportamento paramagnético, com uma curva de magnetização característica deste tipo de material. Os valores de Ms encontrados foram mais baixos do que os valores característicos da magnetita (92-100 emu/g) e maguemita (60-80 emu/g) e estão associados a efeitos superficiais causados pela modificação química da partícula (Sinniah et al., 2015). A variação de Ms para as partículas sintetizadas sem o uso do ultrassom foi de cerca de 11 emu/g enquanto que para as partículas sintetizadas com o uso do ultrassom este valor foi aumentado para cerca de 16 emu/g conforme observado nos valores medidos, isto corresponde a redução de aproximadamente 18 % e 29 %, respectivamente. De acordo com o observado, segundo Gao et al. (2015), esta diferença no valor da magnetização de cada componente está relacionada à inserção de um grupo orgânico na superfície da partícula de magnetita, sendo este comportamento também observado neste trabalho. A redução da constante de saturação magnética no suporte sintetizado em banho de ultrassom sem a alteração da constituição cristalina das partículas comprova a maior quantidade de lauril sulfato que foi ligada à magnetita.

Em relação ao valor total da magnetização de cada amostra, pode-se observar a mesma relação entre estes valores com a extensão da reação de síntese e de substituição e comparando com o comportamento paramagnético similar ao das partículas de magnetita, se pode constatar que o uso do ultrassom aumentou a inserção dos grupos oxalato nas nanopartículas de magnetita. Da mesma forma, esta observação se estende para a substituição por radicais lauril sulfato. A maior disponibilidade de radicais oxalato na superfície da partícula confere a tendência de maior inserção dos radicais lauril sulfato na partícula de magnetita.

De acordo com o exposto acima é possível notar a influência do ultrassom na síntese deste suporte quanto ao seu comportamento magnético. Embora suas propriedades estejam em consonância com as identificadas como características da magnetita, seus valores são inferiores, como consequência do grupo químico ligado a sua superfície, o qual não possui propriedades magnéticas.

5.2 IMOBILIZAÇÃO DAS LIPASES E CARACTERIZAÇÃO

5.2.1 Isotermas de adsorção

Para melhor conhecimento do comportamento da imobilização por adsorção física foram aplicados os modelos de isotermas de Langmuir e Freundlich representadas pelas seguintes Equações (06) e (07), respectivamente:

$$q_e = \frac{q_m \cdot K_L \cdot C_e}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (06)$$

$$q_e = K_F \cdot C_e^{1/n} \quad (07)$$

Sendo:

C_e = Concentração de lipase;

q_e = Quantidade de lipase adsorvida no equilíbrio;

q_m = Quantidade máxima de lipase adsorvida;

K_L = Constante de Langmuir;

K_F = Constante de Freundlich;

n = medida do grau de heterogeneidade da superfície de acordo com a isoterma de Freundlich.

As equações linearizadas para estes modelos estão representadas nas equações a (08) e (09):

$$\frac{C_e}{q_e} = \frac{1}{q_m} \cdot C_e + \frac{1}{K_L \cdot q_m} \quad (08)$$

$$\log(q_e) = \log(K_F) + 1/n \cdot \log(C_e) \quad (09)$$

A isoterma de Langmuir também pode ser expressa por uma constante adimensional chamada de fator de separação R_L , cuja definição está expressa na Equação (10):

$$R_L = \frac{1}{1 + K_L \cdot C_e} \quad (10)$$

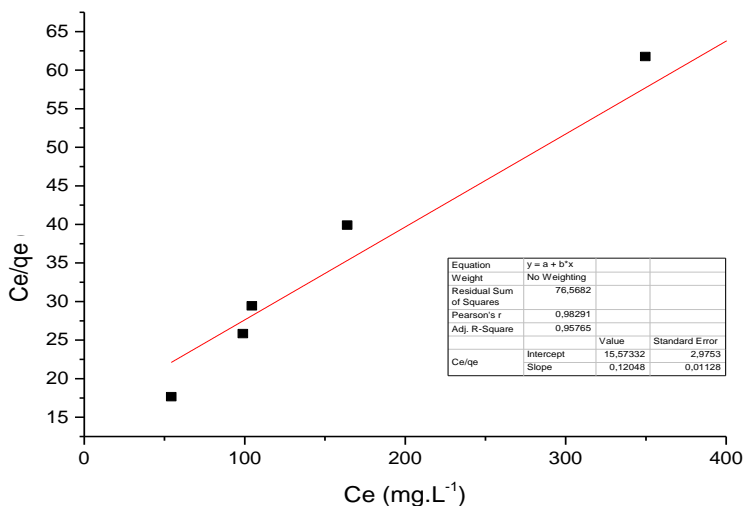
Os valores obtidos através dos cálculos realizados com a Equação (10) indicam a adequação do processo de adsorção ao ensaio realizado com determinado adsorbato e seu adsorvente. De acordo com a Tabela 11, cada valor calculado atribui um índice ao processo de adsorção realizado (ARIVOLI e THENKUZHALI, 2008):

Tabela 11. Valores do fator de separação (R_L) e seu significado em relação à adequação do processo de adsorção.

R_L	Atribuição
0	Irreversível
1	Linear
> 1	Desfavorável
$0 < R_L < 1$	Favorável

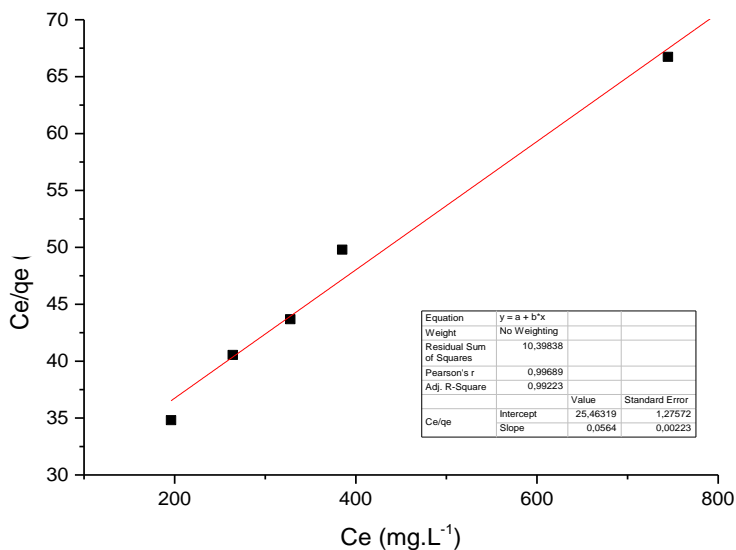
As isotermas de adsorção das enzimas RM e CALB em NSM-SDS foram investigadas de acordo com os modelos de Langmuir e Freundlich e o resultado está demonstrado da Figura 28 até a Figura 31.

Figura 28. Isoterma de adsorção da lipase RM no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Langmuir.



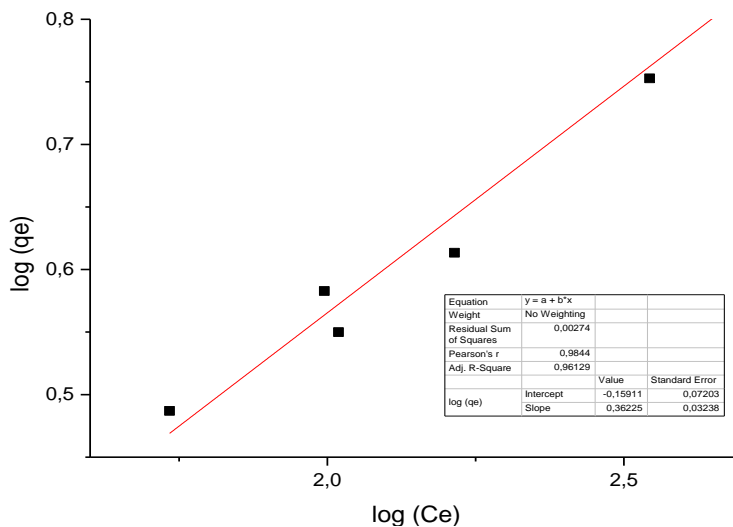
Foram feitos ensaios com concentrações de lipase no equilíbrio (C_e) de 54, 99, 104, 164, 350 e 495 mg.L^{-1} . Foram coletadas alíquotas de 100 μL e colocadas em tubos de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** massa de NSM-SDS de 0,2 g; Lipase RM comercial dissolvida em solução de NaCl 0,2 M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25°C, Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm.

Figura 29. Isotherma de adsorção da lipase CALB no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Langmuir.



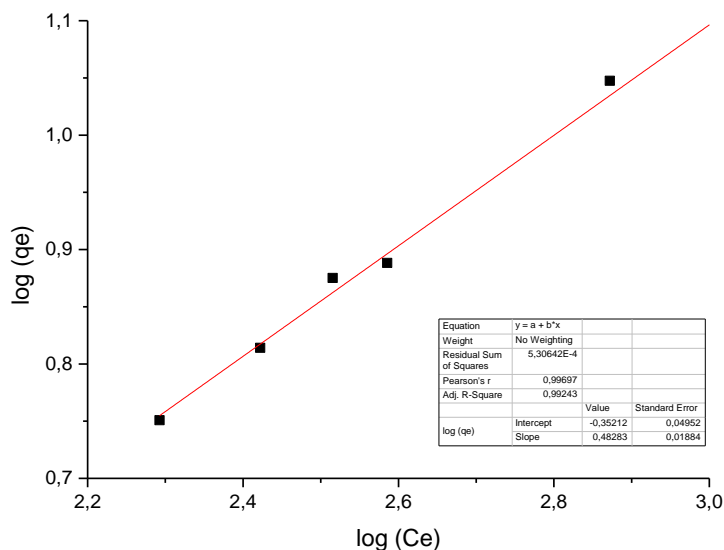
Foram feitos ensaios com concentrações de lipase no equilíbrio (C_e) de 196, 264, 327, 385, 744 e 1.022 mg.L^{-1} . Foram coletadas alíquotas de 100 μL e colocadas em tubos de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** massa de NSM-SDS de 0,2 g; Lipase CALB comercial dissolvida em solução de NaCl 0,2 M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25°C, Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm.

Figura 30. Isoterma de adsorção da lipase RM no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Freundlich.



Foram feitos ensaios com concentrações de lipase no equilíbrio (C_e) de 54, 99, 104, 164, 350 e 495 mg.L^{-1} . Foram coletadas alíquotas de 100 μL e colocadas em tubos de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** massa de NSM-SDS de 0,2 g; Lipase RM comercial dissolvida em solução de NaCl 0,2 M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25°C, Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm.

Figura 31. Isoterma de adsorção da lipase CALB no suporte NSM-SDS a 25 °C e pH 7 de acordo com o modelo de Freundlich.



Foram feitos ensaios com concentrações de lipase no equilíbrio (C_e) de 196, 264, 327, 385, 744 e 1.022 mg.L^{-1} . Foram coletadas alíquotas de 100 μL e colocadas em tubos de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** massa de NSM-SDS de 0,2 g; Lipase CALB comercial dissolvida em solução de NaCl 0,2 M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25°C, Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm.

Pode ser observado o crescimento linear da adsorção da enzima RM e CALB na faixa de concentração estudada. De acordo com Gao et al. (2015), este comportamento sugere que a maior quantidade de CALB adsorvida em NSM-SDS está relacionada ao maior reconhecimento de locais de sítios específicos complementares associado aos efeitos químicos, tamanho molecular, e estrutura espacial existente na rede do suporte, enquanto que a imobilização da enzima é regulada por um efeito não específico.

As constantes das isotermas e os coeficientes do ajuste realizado com os dados experimentais estão apresentados na Tabela 12.

Tabela 12. Resultados da análise das isotermas de adsorção das enzimas RM e CALB no suporte NSM-SDS a 25°C, pH 7 e em solução 0,2 M de NaCl.

Lipase	Modelo de Langmuir			Modelo de Freundlich		
	R^2	q_m (mg.g ⁻¹)	K_L (L.mg ⁻¹)	R^2	n	K_F (mg.g ⁻¹)
RM	0,96	8,30	0,0041	0,96	2,76	0,69
CALB	0,99	17,73	0,0015	0,99	2,07	0,44

Embora ambos os modelos apresentem bons resultados de ajuste através da análise do seu R^2 . O comportamento do R_L calculado a partir dos cálculos da isoterma de Langmuir podem ser observados nas Figuras 32 e 33:

Figura 32. Valores de R_L utilizando diferentes concentrações iniciais de lipase RM dissolvida em NaCl 0,2 M, pH 7 e 25 °C.

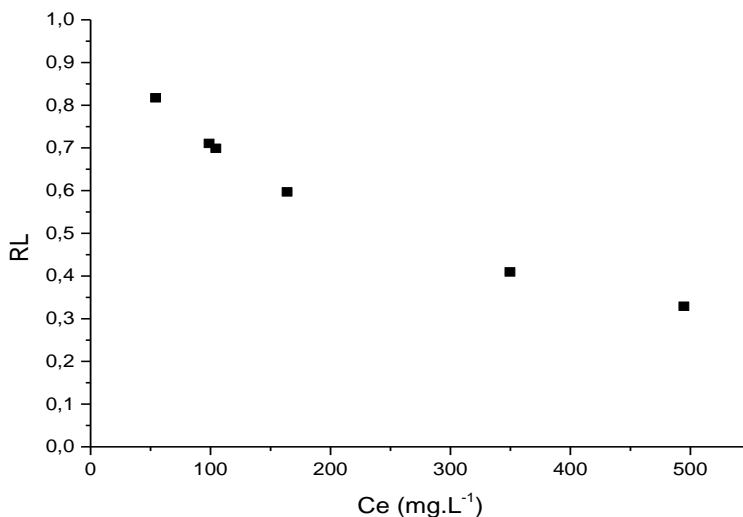
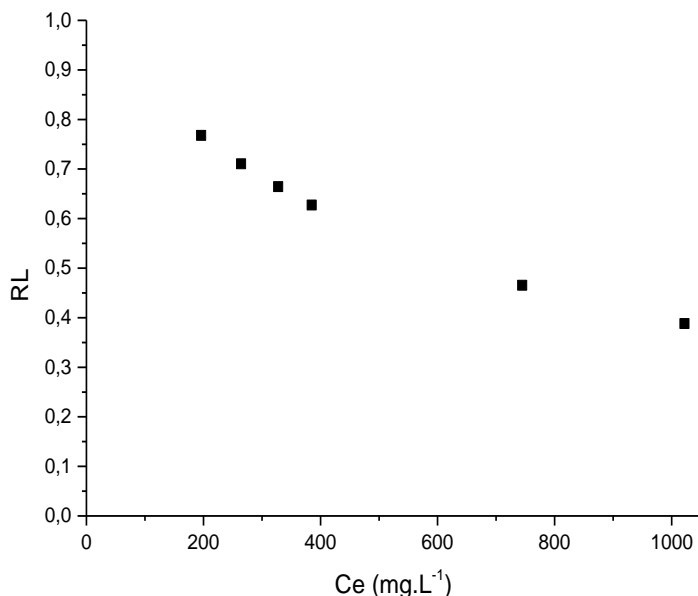


Figura 33. Valores de R_L utilizando diferentes concentrações iniciais de lipase CALB dissolvida em NaCl 0,2 M, pH 5 e 25 °C.



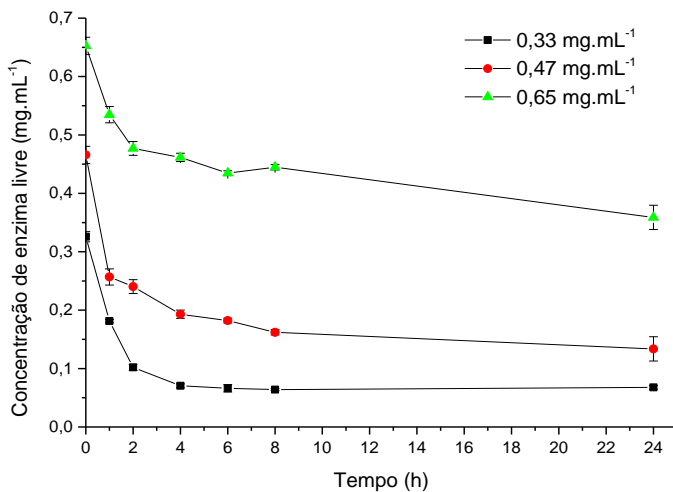
Através dos resultados expostos acima se pode ver que em ambos os casos o valor do fator de separação, este se manteve sempre abaixo de 1 e acima de 0 utilizando diferentes concentrações iniciais de enzimas, o que indica que o processo de adsorção é favorável.

Comparando com o resultado observado aplicando o modelo de Freundlich, é observada boa correlação entre os dados medidos e este modelo. Neste caso, pode se admitir que assim como constatado nos estudos de adsorção/dessorção de N₂ por método BET, estas partículas irão adsorver enzimas primeiramente em monocamada (modelo de Langmuir) passando a adsorver em multicamada assim que a monocamada estiver saturada com a lipase adsorvida.

5.2.2 Influência da concentração de enzima solubilizada

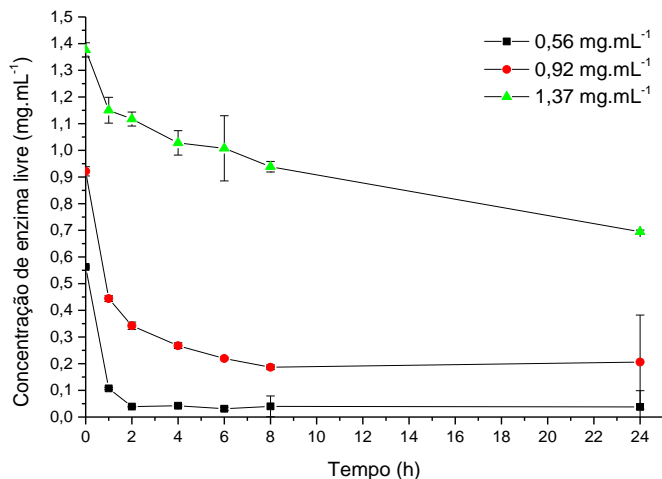
As Figuras 34 e 35 mostram os gráficos de comportamento da imobilização das lipases no suporte sintetizado em diferentes concentrações iniciais de enzima. As barras pretas simbolizam o desvio padrão calculado em torno da média aritmética das triplicatas.

Figura 34. Curva de imobilização da RM ao longo do tempo de contato do suporte com a lipase na forma solúvel em diferentes concentrações.



As amostragens foram realizadas em triplicata. Foram programadas coletas nos tempos $t = 0, 1, 2, 4, 6, 8$ e 24 h, a cada coleta foi assegurado que não fossem arrastadas partículas do suporte através do uso de magnetos nas paredes do reator encamisado. Cada alíquota de $100 \mu\text{L}$ foi colocada em tubo de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** massa de NSM-SDS de $0,2$ g; Lipase RM comercial dissolvida em solução de NaCl $0,2$ M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25°C , Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm.

Figura 35. Curva de imobilização da CALB ao longo do tempo de contato do suporte com a lipase na forma solúvel em diferentes concentrações



As amostragens foram realizadas em triplicata. Foram programadas coletas nos tempos $t = 0, 1, 2, 4, 6, 8$ e 24 h, a cada coleta foi assegurado que não fossem arrastadas partículas do suporte através do uso de magnetos nas paredes do reator encamisado. Cada alíquota de $100 \mu\text{L}$ foi colocada em tubo de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** massa de NSM-SDS de $0,2$ g; Lipase CALB comercial dissolvida em solução de NaCl $0,2$ M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25°C , Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm.

Em ambos os casos, a adsorção das enzimas ocorreu em dois regimes cinéticos distintos: um aumento linear da concentração na superfície até cerca de 1 hora de imobilização seguida por uma mudança de comportamento a qual se caracteriza por ter a adsorção mais lenta da enzima remanescente até o fim do processo. O comportamento observado se compara ao descrito no trabalho de Foresti et al. (2010), no qual a enzima CALB foi imobilizada em suporte de TiO_2 apresentando a adsorção até no período de 1 hora de imobilização da enzima. Ainda segundo Foresti et al. (2010), este comportamento de adsorção das enzimas o suporte provavelmente segue o modo de adsorção sequencial aleatória, no qual a sequência de proteína adsorvente ocupa a superfície disponível em primeiro lugar, e depois mais enzimas são adsorvidas com a formação de agregados.

A Tabela 13 apresenta os resultados quantificados pelo método de Bradford das diferentes concentrações de solução de enzima RM residual após 24 horas de agitação.

Tabela 13. Resultado da imobilização da enzima RM no suporte sintetizado em termos de concentração mássica e percentual.

Concentração de enzima (mg.mL⁻¹)	Imobilização (mg.g_{suporte}⁻¹)	Rendimento de imobilização (%)
0,33	5,28	80,00
0,47	6,75	71,82
0,62	5,02	40,47

Ao usar a concentração de 0,33 mg.mL⁻¹ ocorreu o maior percentual de imobilização da enzima. No entanto, ao usar 0,47 mg.mL⁻¹ ocorreu a imobilização da maior massa de enzima por grama de suporte utilizado, sendo esta, então, a concentração selecionada para o preparo da enzima imobilizada no suporte desenvolvido neste trabalho. Para a concentração de 0,62 mg.mL⁻¹ verifica-se um decréscimo acentuado na quantidade de enzima imobilizada, uma vez que devido a sua concentração e força iônica, a mesma sofreu maior influência do mecanismo de precipitação por ligação cruzada do que a adsorção física, o que não é desejável, uma vez que para o reuso este suporte é sequencialmente lavado, removendo assim todo o conteúdo que não estiver ligado ao suporte.

A Tabela 14 apresenta os resultados quantificados pelo método de Bradford das diferentes concentrações de solução de enzima CALB residual após 24 horas de agitação.

Tabela 14. Resultado da imobilização da enzima CALB no suporte sintetizado em termos de concentração mássica e percentual.

Concentração de enzima (mg.mL⁻¹)	Imobilização (mg.g_{suporte}⁻¹)	Rendimento de imobilização (%)
0,56	9,12	80,97
0,92	8,17	88,69
1,38	3,41	49,55

A solução com 0,92 mg.mL⁻¹ de enzima apresentou o maior percentual de imobilização. Maiores concentrações de enzimas sofrem maior influência do mecanismo de precipitação por ligação cruzada do

que a adsorção física, portanto, foram alcançados baixos valores de imobilização com solução a $1,38 \text{ mg.mL}^{-1}$.

A Tabela 15 apresenta os resultados de atividade hidrolítica medidos para as enzimas imobilizadas e das mesmas livres e imobilizadas disponíveis comercialmente.

Tabela 15. Atividade hidrolítica e de esterificação das enzimas imobilizadas em NSM-SDS, livre e imobilizadas disponíveis comercialmente.

Enzima	Atividade hidrolítica (U.g⁻¹)	Atividade de esterificação (U.g⁻¹)
NSM-RM	997,00	27,57
NSM-CALB	928,52	20,91
RM livre*	2633,70	31,01
CALB livre*	737,56	33,96
Lipozyme RM IM**	262,72	14,97
Novozym 435**	1422,15	25,37

* Lipases líquidas. Foram pesados 0,200 g do preparado para a medida da atividade.

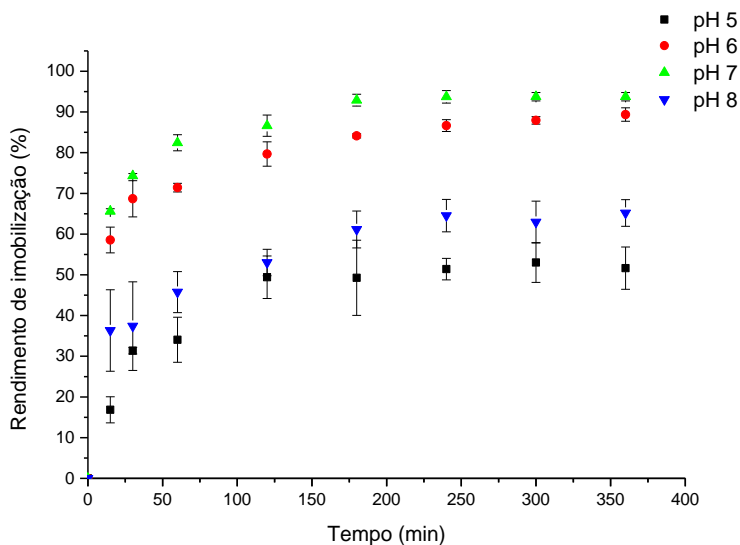
** Variedades comerciais imobilizadas das lipases estudadas.

Observa-se que as lipases adsorvidas em NSM-SDS apresentaram atividades semelhantes. Se forem comparados os resultados medidos para as enzimas comerciais com os resultados para as enzimas imobilizadas percebe-se que no caso da lipase de RM, a variedade comercial apresentou valor inferior à mesma imobilizada no suporte paramagnético. Porém, neste caso acredita-se que a enzima comercial utilizada já estava parcialmente desativada não apresentando o real valor comumente alcançado para uma lipase comercial com data de fabricação mais recente. Já em relação à enzima CALB, a variedade comercial apresentou atividade hidrolítica 53 % superior à imobilizada em NSM-SDS, sendo que isto aconteceu também em relação à atividade hidrolítica, sendo que a variedade comercial apresentou atividade 24 % superior à imobilizada em NSM-SDS.

5.2.3 Influência do pH

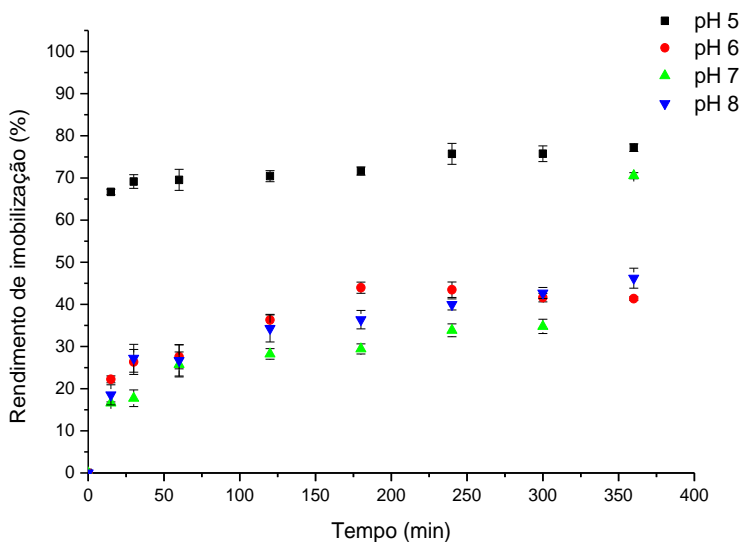
As Figuras 36 e 37 apresentam os resultados da imobilização das enzimas utilizando solução de NaCl 2 M em diferentes pHs.

Figura 36. Ensaio de adsorção da enzima RM em diferentes pHs.



As amostragens foram realizadas em triplicata. Foram programadas coletas nos tempos $t = 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300$ e 360 min. A cada coleta foi assegurado que não fossem arrastadas partículas do suporte através do uso de magnetos nas paredes do reator encamisado. Cada alíquota de $100 \mu\text{L}$ foi colocada em tubo de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** Massa de NSM-SDS de $0,2$ g; Lipase RM comercial dissolvida em solução de NaCl $0,2$ M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25 °C; Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm; pH corrigido com gotas de solução de H_2SO_4 e NaOH 1 M e agitadas com agitador magnético.

Figura 37. Ensaio de adsorção da enzima CALB em diferentes pHs.



As amostragens foram realizadas em triplicata. Foram programadas coletas nos tempos $t = 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300$ e 360 min. A cada coleta foi assegurado que não fossem arrastadas partículas do suporte através do uso de magnetos nas paredes do reator encamisado. Cada alíquota de $100 \mu\text{L}$ foi colocada em tubo de ensaio, a seguir adicionado solução de Bradford, os tubos foram agitados em agitador tipo vórtex e após dois minutos analisado em espectrofotômetro. **Condições experimentais:** Massa de NSM-SDS de $0,2$ g; Lipase CALB comercial dissolvida em solução de NaCl $0,2$ M; Volume de líquido de 20 mL; reator encamisado e termostatizado a 25 °C; Velocidade de agitação mecânica de 600 rpm; pH corrigido com gotas de solução de H_2SO_4 e NaOH 1 M e agitadas com agitador magnético.

Os resultados mostram que o pH utilizado na imobilização das enzimas estudadas neste trabalho possui influência no rendimento total da imobilização. Para a enzima RM em pH 5 foi alcançado cerca de 51% de imobilização e em pH 7 este percentual aumenta para quase 94 % da enzima dissolvida.

Para a enzima CALB, os resultados observados apontam um comportamento oposto ao observado para a enzima RM, enquanto que em pH 7, ocorreu 70 % da imobilização da enzima, em pH 5 este percentual se elevou para 77 %.

Embora o ensaio realizado com a enzima RM apresente maior resultado na quantidade de enzima adsorvida, é necessário observar que o preparado enzimático utilizado como material de pesquisa para a enzima CALB continha concentração cerca de 15 % a mais de enzima

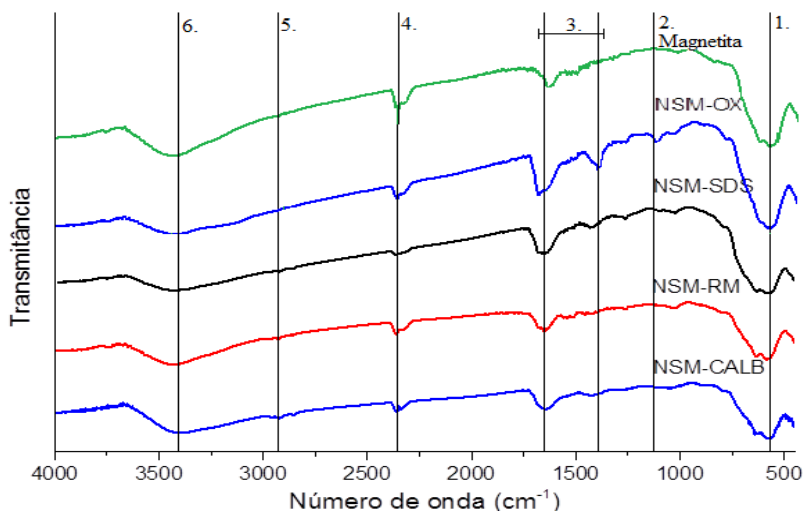
dissolvida ($9,02 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) em relação a enzima RM ($7,71 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em relação aos desvios padrão calculados através das medidas das triplicatas se pode observar somente que para a lipase RM nos pHs 5 e 8 os valores excederam o mínimo tolerável ($\pm 3 \%$). Conforme os valores medidos, já se pode observar também que a lipase RM possui maior sensibilidade ao pH em relação aos valores medidos para a lipase CALB.

Com este ensaio foi determinada que o melhor pH a ser utilizado para imobilização da enzima RM foi o pH 7 e para a enzima CALB foi o pH 5. Estes resultados condizem ao esperado com a análise do potencial zeta a qual indicou que o ponto isoelétrico do suporte é em pH 7.

5.2.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 38 apresenta o resultado da análise de FTIR da magnetita pura, NSM-OX e NSM-SDS.

Figura 38. Comparação dos espectros de infravermelho dos compostos sintetizados.



Os picos da região **1**, entre 560 e 590 cm^{-1} são referentes ao estiramento da ligação Fe-O. Na região **2**, o primeiro pico se refere aos estiramentos das moléculas de CO_2 presentes nas moléculas do suporte,

especialmente em NSM-OX e NSM-SDS. Porém, é nesta mesma região que se encontram as evidências necessárias para a identificação qualitativa das proteínas adsorvidas no suporte o segundo pico da região **2.**, destacado pela região **3.**, pode-se perceber que ocorre um pequeno deslocamento de banda de 1660 cm^{-1} para 1630 cm^{-1} com outros picos secundários na região de 1410 cm^{-1} indicando a presença de proteína adsorvida. As moléculas de água causam alguma interferência nesta mesma região, porém o deslocamento de banda é perceptível quando se comparam os espectros do suporte puro com o do suporte contendo as enzimas (BARBOSA, 2007).

Os picos observados destacados pela região **3.** estão localizados em uma região indicada por outros trabalhos como Amida I ($\sim 1650\text{ cm}^{-1}$) são atribuídos a α -hélices, folhas β e segmentos desordenados (FORESTI et al., 2010).

A região **4.**, próximo a 2360 cm^{-1} , presente em todas as amostras corresponde ao movimento assimétrico de moléculas de CO_2 adsorvidas na amostra, sendo este pico especialmente definido na amostra de magnetita pura, uma vez que esta foi preparada em condições alcalinas, o que favorece a reação com o CO_2 atmosférico (BARBOSA, 2007).

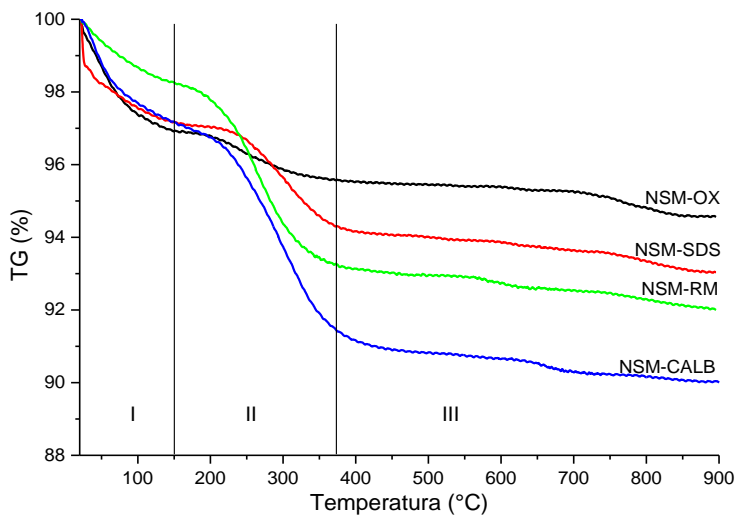
A região **5.**, de 2840 a 2960 cm^{-1} , possível de ser observada nos espectros do suporte puro e contendo a enzima, corresponde as ligações do tipo $-\text{CH}_2-$ do grupamento lauril inserido na partícula magnética e de alguma forma intensificado pelos grupos apolares presentes nas moléculas das enzimas imobilizadas (MANAN et al., 2015).

Por fim, a região **6.**, formada por uma banda com ponto de máxima em torno de 3440 cm^{-1} corresponde a região que poderia ser atribuída aos aminoácidos terminais presentes na enzima, uma vez que esta região se intensifica para a região contendo as enzimas imobilizadas. Porém, é nesta mesma região que as moléculas de água têm sua maior absorção no infravermelho, sendo bastante intensa para a amostra de magnetita pura, não servindo, portanto, esta região de referencial para a análise qualitativa da imobilização (BARBOSA, 2007).

5.2.5 Termogravimetria

A Figura 39 mostra o resultado da análise termogravimétrica de NSM-Ox, NSM-SDS, NSM-RM e NSM-CALB.

Figura 39. Análise termogravimétrica do suporte com e sem enzima – TG versus T.



A análise foi realizada utilizando aproximadamente 10 mg de amostra colocada em cadinho de platina. As condições reacionais foram: taxa de aquecimento: 20 °C.min⁻¹; Temperatura final: 900 °C; Atmosfera: Ar Sintético; Vazão de gás: 100 mL.min⁻¹; Intervalo de amostragem de dados: 1 s.

O termograma pode ser dividido em três regiões distintas principais. A região I corresponde a zona de perda de massa por perda de umidade superficial e umidade ligada, compreendida entre 25 e 145 °C. Nesta mesma região ainda se pode notar a formação de um patamar que corresponde à região de transição da magnetita para a maguemita, o que faz que ocorra um ganho de massa de pequena magnitude devido à oxidação do ferro II constituinte da magnetita para ferro III da maguemita (SARTORATTO et al., 2007).

A região II, de 145 a 355 °C corresponde à zona de oxidação da matéria carbônica ligada as partículas de magnetita (SARTORATTO et al., 2007), sejam estas o oxalato, o lauril sulfato, a lipase RM e a lipase CALB.

A região III, 355 a 900 °C corresponde à zona de oxidação de algum carbono residual que não tenha sido oxidado na região II e nesta região a maguemita passa da fase γ -Fe₂O₃ para α -Fe₂O₃ (comumente ocorrem as duas fases entre 500 e 700 °C (SARTORATTO et al., 2007)), ou seja, não ocorre variação de massa que possa despertar algum

estudo mais aprofundado, apenas ocorre mudança na estrutura cristalina do material suporte.

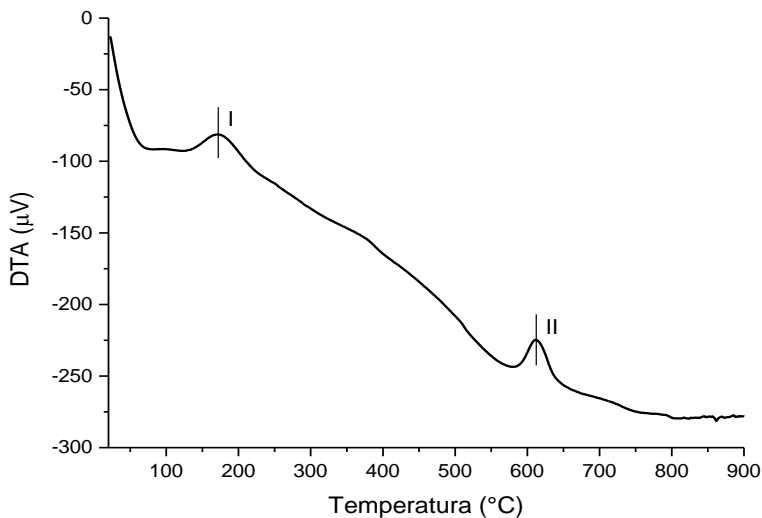
A Tabela 16 mostra o percentual de perda de massa ocorrido em cada região referente a cada amostra analisada.

Tabela 16. Perda de massa (Δm) em cada região e para cada amostra.

Amostra	Região I - Δm (%)	Região II - Δm (%)	Região III - Δm (%)
NSM-Ox	3,03	1,36	1,03
NSM-SDS	2,84	2,68	1,44
NSM-RM	1,67	4,87	1,45
NSM-CALB	2,91	5,90	1,38

A Figura 40 mostra o resultado da análise diferencial térmica de NSM-Ox (a.), NSM-SDS (b.), NSM-RM (c.) e NSM-CALB (d.):

Figura 40. Análise diferencial térmica (DTA) – DTA versus T da amostra NSM-SDS.



A análise foi realizada utilizando aproximadamente 10 mg de amostra colocada em cadinho de platina. As condições reacionais foram: taxa de aquecimento: 20 °C. min⁻¹; Temperatura final:

900 °C; Atmosfera: Ar Sintético; Vazão de gás: 100 mL.min⁻¹; Intervalo de amostragem de dados: 1 s.

A análise diferencial térmica permite a visualização dos eventos térmicos ocorridos durante a análise termogravimétrica. Como os resultados de DTA para todas as amostras foram idênticos, para demonstração foi colocado o resultado da análise de DTA do suporte NSM-SDS. É possível identificar dois picos endotérmicos distintos, o primeiro (I) por volta de 170 °C confirma a temperatura de transição da magnetita para maguemita e remoção da água ligada na superfície do material e o segundo (II), por volta de 610 °C a transformação de γ -Fe₂O₃ para α -Fe₂O₃.

5.2.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Como forma de melhor visualizar as características do suporte com e sem lipase bem como observar melhor o grau de aglomeração o qual estas partículas se encontram, foram feitas análises de microscopia eletrônica de varredura. As Figuras 41 até 44 mostram as micrografias de MEV obtidas.

Figura 41. Análise de superfície das partículas de NSM-OX. Aumento de 5000 X.

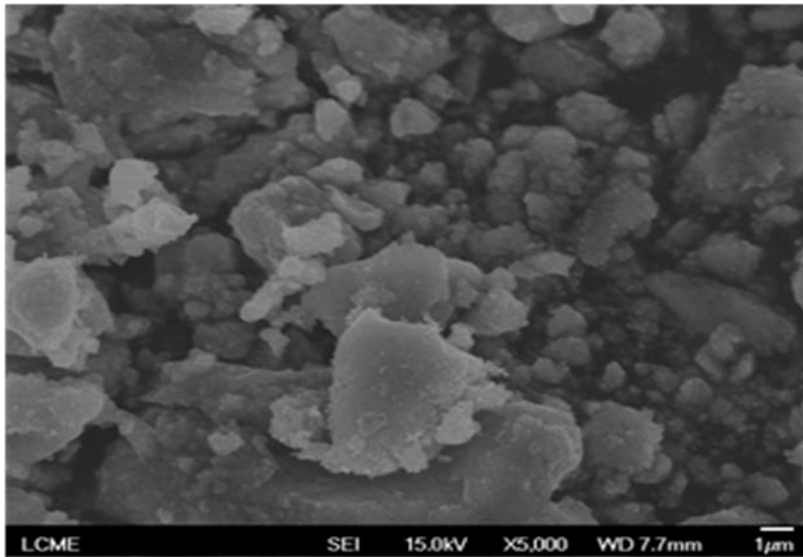


Figura 42. Análise de superfície das partículas de NSM-SDS. Aumento de 5000 X.

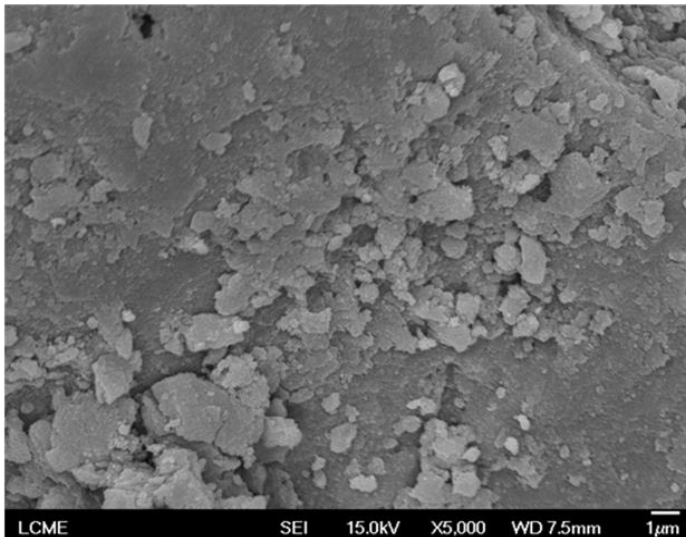


Figura 43. Análise de superfície das partículas de NSM-RM. Aumento de 5000 X.

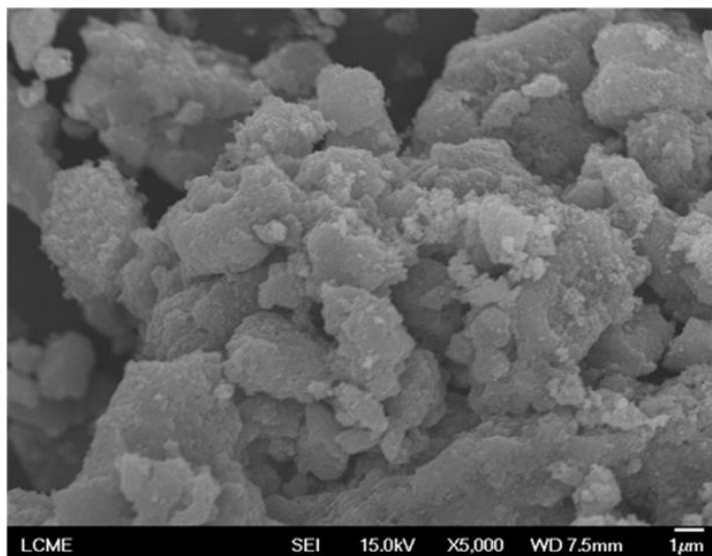
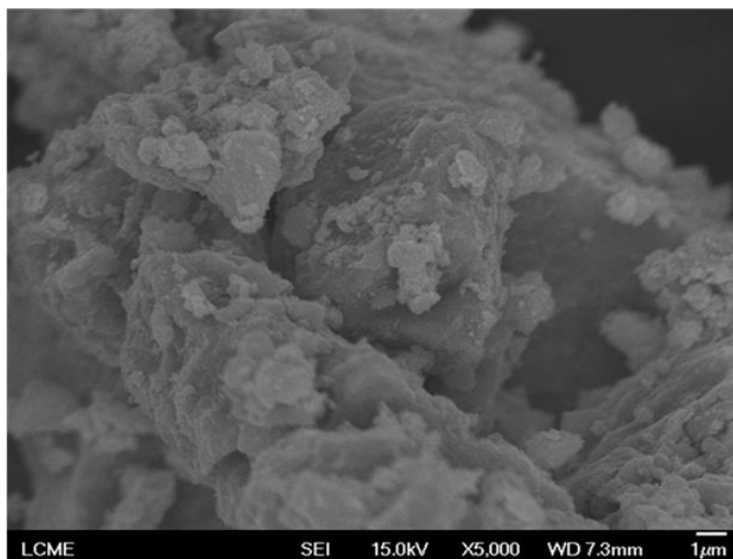


Figura 44. Análise de superfície das partículas de NSM-CALB. Aumento de 5000 X.



É possível observar em todos os casos que as partículas estão aglomeradas e por isto apresentam tamanhos maiores em relação ao esperado para uma nanopartícula isolada. Conforme demonstrado nos itens anteriores, a partícula não agregada possui tamanho próximo de 10 nm, porém devido à baixa carga superficial medida pela análise do potencial zeta, estas partículas tendem a se aglomerar, tal qual verificado nesta análise. Comparando os valores dos tamanhos das nanopartículas por MET, SEM e o valor da área superficial é possível entender o fato de que mesmo com grãos maiores a área superficial da partícula de NSM-SDS sintetizada com ultrassom tem maior área superficial. O fato de estar aglomerada e floculada não quer dizer que o tamanho da nanopartícula de fato seja este. Logo, a área superficial é maior, pois na medida segundo BET as partículas estavam mais finas (foram secas e pulverizadas) do que as analisadas por SEM e no Lumiziser.

5.2.7 Ensaios da estabilidade a solventes

Este ensaio busca investigar a influência do uso de solventes em processos enzimáticos e como estes podem alterar a atividade das lipases durante o tempo de contato com os mesmos.

As lipases NSM-RM e NSM-CALB foram misturadas a cerca de 10 mL de solventes com diferentes polaridades, agitadas e mantidas à temperatura ambiente por 24 horas em contato com os solventes. Ao término deste período o solvente vertido e as partículas lavadas com solução tampão fosfato 0,05 M e pH 7 até que o excesso de solvente fosse removido da superfície das mesmas. O objetivo não era de eliminar o solvente, e sim retirar o excesso que pudesse interferir na quantificação da atividade. Na sequência foram realizados os ensaios de atividade hidrolítica para cada lipase.

A Tabela 17 apresenta os resultados do ensaio de contato dos solventes em contato com as lipases.

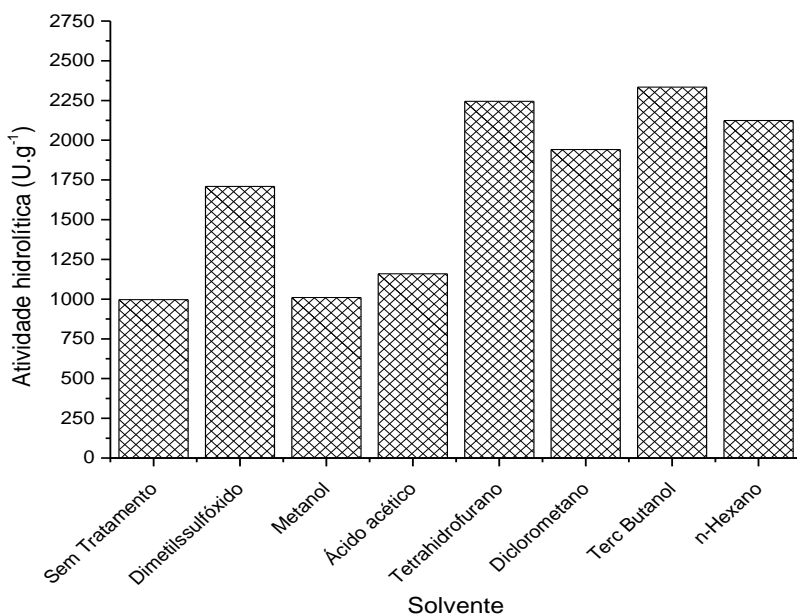
Tabela 17. Ensaio de estabilidade a solventes com os resultados da medida da atividade hidrolítica após 24 horas de contato com os solventes com suas respectivas polaridades (log P).

Solvente	Log P	NSM-RM	NSM-CALB
Sem tratamento	-	997,00	928,52
Dimetilssulfóxido	-1,30	1.709,43	1.613,83
Metanol	-0,76	1.010,29	1.062,24
Ácido acético	-0,17	1.159,83	790,94
Tetrahidrofurano	0,49	2.244,51	2.439,61

Diclorometano	0,93	1.941,92	2.085,46
Terc Butanol	1,45	2.333,86	1.735,69
n-Hexano	3,50	2.123,71	2.622,00

Os dados são mais bem visualizados na forma de histogramas. A Figura 45 apresenta o resultado da atividade hidrolítica da lipase NSM-RM após contato de 24 horas com solventes de diferentes polaridades.

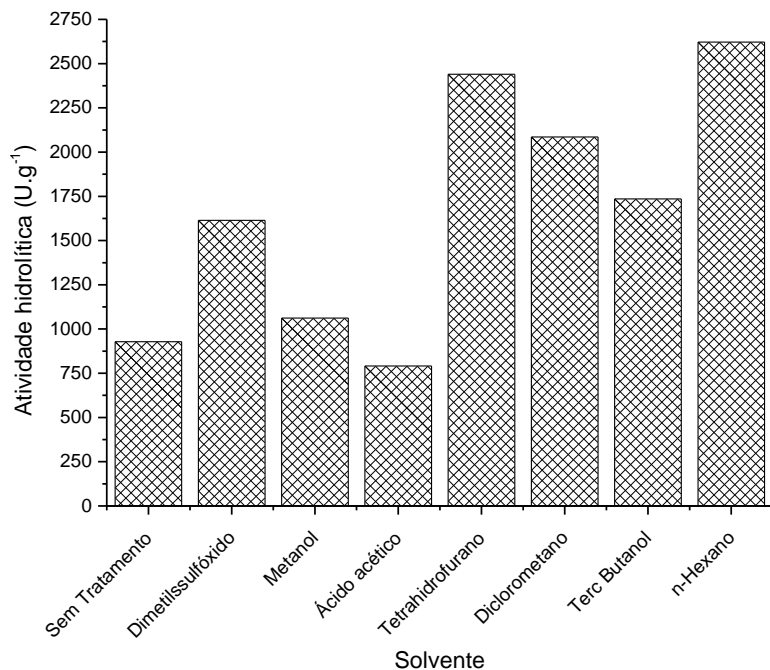
Figura 45. Atividade hidrolítica da lipase NSM-RM após contato com solventes de diferentes polaridades por 24 horas.



Os ensaios foram realizados utilizando 0,200 g de NSM-RM pesados em balança analítica e acondicionados em tubos de ensaio com tampa. Foram misturados 10 mL de cada solvente e após tampar os tubos toda a mistura foi agitada. Os tubos foram guardados à temperatura ambiente por um período de 24 horas ocorrendo agitação ocasional de todo o conteúdo. Após o término do tempo estipulado a lipase imobilizada foi atraída com um magneto no fundo do tubo e o solvente descartado. A seguir, foram feitas sucessivas lavagens com solução tampão fosfato 0,05 M pH 7 para então ser ensaiada a atividade hidrolítica da lipase.

A Figura 46 apresenta o resultado da atividade hidrolítica da lipase NSM-CALB após contato de 24 horas com solventes de diferentes polaridades.

Figura 46. Atividade hidrolítica da lipase NSM-CALB após contato com solventes de diferentes polaridades por 24 horas.



Os ensaios foram realizados utilizando 0,200 g de NSM-CALB pesados em balança analítica e acondicionados em tubos de ensaio com tampa. Foram misturados 10 mL de cada solvente e após tampar os tubos toda a mistura foi agitada. Os tubos foram guardados à temperatura ambiente por um período de 24 horas ocorrendo agitação ocasional de todo o conteúdo. Após o término do tempo estipulado a lipase imobilizada foi atraída com um magneto no fundo do tubo e o solvente descartado. A seguir, foram feitas sucessivas lavagens com solução tampão fosfato 0,05 M pH 7 para então ser ensaiada a atividade hidrolítica da lipase.

Para ambas as lipases pôde se constatar que a atividade foi modificada de acordo com a natureza do solvente. A própria estrutura do suporte contendo uma estrutura alifática de doze carbonos na superfície associado aos resultados de eficiência de captura da enzima do meio reacional durante a adsorção física destas confirmam as tendências observadas e são ratificadas pelas características da tampa da enzima RM em relação à CALB fazendo com que esta tenha sofrido maior impacto em relação ao contato com o solvente.

De acordo com os resultados expostos acima, é possível notar que solventes polares tendem a reduzir a atividade da lipase após o tempo de

exposição estipulado para este ensaio. O uso de solventes apolares, por sua vez, apresentou efeito inverso ocasionando o aumento na atividade e este aumento foi crescente conforme decrescia a polaridade do solvente.

De acordo com Szabó et al. (2009), a estabilidade das enzimas é um dos problemas mais difíceis na química de proteínas, e, conseqüentemente, existe um grande interesse na compreensão dos efeitos de solventes orgânicos sobre a estabilidade de enzimas, e no desenvolvimento de novas estratégias para melhorar a sua produtividade.

Este resultado corrobora com o fenômeno observado nos trabalhos de Verri et al. (2015) e Kamal et al. (2013). Solventes polares tendem a desativar totalmente a enzima contida no catalisador por causa da remoção de água necessária para manter a conformação nativa e ativa da enzima. Pelo contrário, os solventes hidrófobos, devido à sua baixa tendência a retirar a água essencial no microambiente de enzimas, permitiu preservar a sua atividade (VERRI et al. (2015; KRISHNA et al., 2001) e inclusive aumentar a mesma (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; MATEO et al., 2007; MATSUMOTO, KIDA e KONDO, 2001) conforme discutido no ensaio de reuso das enzimas.

O efeito da presença de solventes orgânicos em reações enzimáticas de hidrólise é amplamente discutido na literatura, porém no que se refere às alterações na atividade enzimática desta enzima em relação à presença dos solventes ainda há muito que se investigar. Informações encontradas na literatura, como no trabalho de Kamal et al., (2013) aponta quatro fatores majoritários no que se refere à alteração da atividade enzimática com a presença de solventes, são estes:

I – a água ou o solvente podem ser substratos da reação;

II – o solvente orgânico pode agir como um inibidor da reação;

III – os solventes orgânicos sofrem alterações em suas propriedades volumétricas, tais como constante dielétrica, polaridade e hidrofobicidade e assim por diante, que por sua vez afeta a solvatação do substrato e/ou de estados de transição e influencia a sua ligação à molécula de enzima;

IV – o solvente orgânico altera a estrutura da enzima (KAMAL et al., 2013).

Ainda segundo Kamal et al (2013) em seu segundo trabalho publicado sobre o assunto, estas modificações na atividade das enzimas foram investigadas por ressonância magnética nuclear e mostraram que as maiores modificações encontradas na estrutura molecular das enzimas sob ação de solventes se encontra nas camadas mais externas da

molécula, provavelmente devido a alterações na camada de hidratação ou devido à ligação específica de moléculas de solvente orgânico. Neste mesmo trabalho foram identificados quais os resíduos que demonstraram significativamente maior perturbação na estrutura das enzimas por deslocamentos químicos.

Não faz parte desta tese a investigação aprofundada desta constatação, porém, as informações encontradas são de fundamental importância para o entendimento do fenômeno observado durante a realização deste ensaio. Uma vez que a literatura é escassa no que se refere a este assunto, tais constatações abrem um importante núcleo de discussões para o melhor entendimento da interação das enzimas com substratos e/ou solventes com diferentes características químicas. Com isto, será possível aumentar o controle e a estabilidade das reações enzimáticas ampliando ainda mais seu campo de aplicação.

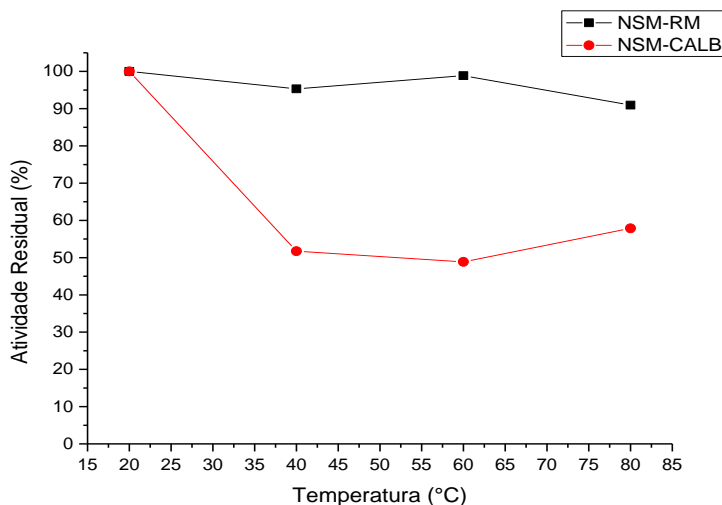
Tais resultados, se comparados às quatro principais possibilidades citadas neste tópico, a de que o solvente orgânico altere a estrutura da enzima é a que mais faz sentido de acordo com os dados obtidos. A lipase RM, por ser menos hidrofílica que a lipase CALB, sofre maior efeito sobre sua atividade com o decorrer do tempo de contato com o solvente. O fato da tampa (*lid*) da enzima RM ser maior que da enzima CALB sugere que esta esteja expondo o sítio ativo da enzima de forma mais acentuada através do contato com o solvente do que o efeito que ocorre com a CALB.

A exceção constatada foi no ensaio realizado com terc-butanol. Este solvente também aumentou a atividade das lipases após o tratamento. Tal fato confirma a preferência do uso do terc-butanol como cossolvente em reações enzimáticas as quais os reagentes possuam pouca miscibilidade entre si ou com o produto final. Exemplo deste caso se tem a produção enzimática de biodiesel etanólico descrita nos trabalhos de Dors (2011) e Henriques (2012) os quais utilizaram o terc-butanol como solvente com o objetivo de elevar os rendimentos em ésteres etílicos de ácidos graxos nas condições operacionais descritas nos referidos trabalhos.

5.2.8 Ensaio de estabilidade térmica

A Figura 47 apresenta o resultado do ensaio de estabilidade das enzimas imobilizadas submetidas a diferentes temperaturas.

Figura 47. Ensaio de estabilidade térmica das enzimas imobilizadas suspensas em isoctano a diferentes temperaturas. (a.) NSM-RM; (b.) NSM-CALB.



Os ensaios foram realizados utilizando 0,200 g de NSM-RM e NSM-CALB pesados em balança analítica e acodicionados em frascos Erlenmeyer de 125 mL. Foram misturados 40 mL de isoctano e após tampar os frascos toda a mistura foi agitada por 24 horas em agitador com movimento orbital. Os ensaios foram realizados nas temperaturas de 20, 40, 60 e 80 °C com amostras novas de lipase imobilizadas provenientes da mesma batelada produzida. Após o término do tempo estipulado a lipase imobilizada foi atraída com um magneto no fundo do tubo e o solvente descartado. A seguir, foram feitas sucessivas lavagens com solução tampão fosfato 0,05 M pH 7 para então ser ensaiada a atividade hidrolítica de cada lipase submetida a cada temperatura.

Os ensaios foram realizados utilizando isoctano como solvente para evitar a evaporação do solvente durante a realização deste ensaio por este possuir maior ponto de ebulição. A atividade hidrolítica inicial medida da NSM-RM foi de $975,86 \text{ U.g}^{-1}$ e da NSM-CALB foi de $914,85 \text{ U.g}^{-1}$. A incubação por duas horas com isoctano e posterior análise da atividade enzimática de hidrólise permitiu a constatação do aumento da atividade hidrolítica. De acordo com o observado e conforme descrito no trabalho de Matsumoto, Kida e Kondo, (2001), o tratamento da enzima com um solvente com log de P elevado como o isoctano ($\log P = 4,5$) favorece as interações hidrofóbicas e pode causar uma conformação desejada para a interação entre o sítio ativo e a enzima.

5.2.9 Teste de reuso

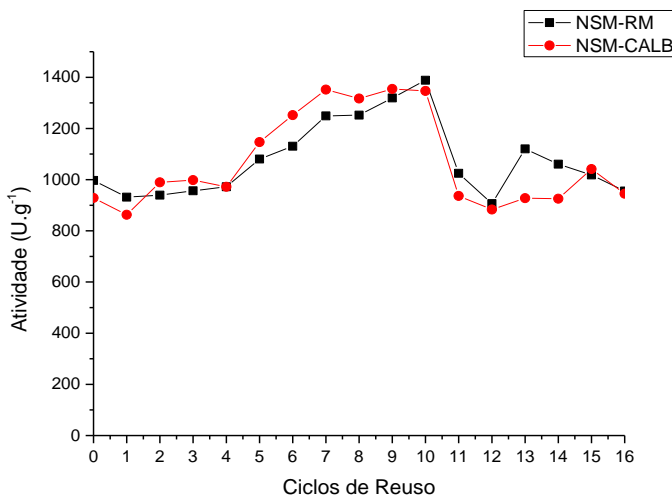
Em relação aos outros tipos de suportes frequentemente utilizados para a imobilização de enzimas, em especial os poliméricos necessitam de lavagens com solventes específicos para que se possa recuperar a enzima imobilizada, o que às vezes não só danifica a estrutura da enzima como também altera a estrutura do próprio suporte.

Por ser um material inorgânico, a magnetita sintetizada contendo um agente ligante de cadeia alquílica saturada tem maior estabilidade em diferentes polaridades. Cabe, no entanto verificar a estabilidade da enzima no processo de recuperação.

Para ambas as enzimas imobilizadas se pôde verificar que lavagens sequenciais com água destilada e agitação seguida de decantação com magneto permitiu a fácil recuperação da enzima imobilizada. Os ciclos de reuso foram realizados com lavagens sucessivas de solução tampão fosfato e decantação das partículas para remoção do sobrenadante. A lavagem foi realizada até que as águas de lavagem se apresentassem incolores e não fosse mais detectado ácido palmítico suspenso. No mesmo tubo era reiniciado o ensaio de atividade para evitar perdas de massa da amostra.

A Figura 48 apresenta o resultado dos testes de reuso das lipases NSM-RM e NSM-CALB. Cada ponto obtido corresponde a um ciclo de reutilização feito no ensaio de hidrólise do palmitato de p-nitrofenila conforme condições descritas nas metodologias.

Figura 48. Comportamento das enzimas NSM-RM e NSM-CALB em sucessivos ciclos de reuso utilizando como método de monitoramento a hidrólise do palmitato de p-nitrofenila



Os ensaios foram realizados utilizando 0,200 g de NSM-RM e NSM-CALB pesados em balança analítica e acondicionados em tubos de ensaio com tampo. Foram realizados sucessivos ensaios de atividade hidrolítica da lipase. Ao término de cada hidrólise, foram feitas sucessivas lavagens com solução tampão fosfato 0,05 M pH 7 para então ser submetida a um novo ensaio de hidrólise.

Pode-se observar a partir do gráfico acima exposto que o reuso da enzima em ciclos de hidrólise consecutivos alcançou dez ciclos com aumento de sua atividade inicial (cerca de 40 %), para então começar a cair sua atividade. Porém, com os dados obtidos pode-se ver que as lipases apresentaram comportamento semelhante permitindo até 16 ciclos de reuso de sem prejuízo considerável a sua atividade inicial.

Embora pouco observado para as enzimas em geral, o comportamento de ativação enzimática já foi reportado na literatura. De acordo com Fernandez-Lafuente (2010), este mecanismo de ação é normalmente chamado de "ativação interfacial" das lipases, e estas alterações conformacionais severas devem ser consideradas no uso destas enzimas como biocatalisadores.

As lipases mostram duas conformações diferentes. A forma fechada, considerada inativa, em que o sítio ativo é isolado a partir do meio reacional pela *lid*, e a forma aberta, na qual esta *lid* é deslocada e o sítio ativo estará totalmente exposto ao meio reacional. Ambas as

formas de lipases estão em equilíbrio e podem ser afetadas pelas condições reacionais. Na presença de substratos hidrofóbicos, as lipases podem tornar-se fortemente adsorvida na interface com estes substratos e o equilíbrio conformacional é deslocado para a forma aberta das lipases (MATEO et al, 2007; MATSUMOTO, KIDA e KONDO, 2001).

Esta constatação reforçam as observações feitas nos ensaios das lipases imobilizadas em contato com solventes com baixa polaridade (característica hidrofóbica) e no ensaio de reuso mostrando que este comportamento de ativação é perfeitamente normal e já observado decorrente das considerações feitas no parágrafo anterior. Os solventes que mais ativaram a lipase, o substrato do ensaio de reuso bem como o próprio suporte possuem características marcadamente hidrofóbicas.

5.3 ESTERIFICAÇÃO DO GLICEROL COM ÁCIDO CAPRÍLICO

As lipases NSM-RM e NSM-CALB foram utilizadas como catalisador na reação de esterificação entre o glicerol e o ácido caprílico com o objetivo de determinar o comportamento do uso destas enzimas imobilizadas em reações em regime de batelada com variadas proporções dos reagentes objetivando aumentar a produção de monocaprilina, sendo esta a aplicação escolhida para este trabalho. Com o reconhecimento das propriedades microbocidas inerentes aos mono e diglicerídeos de ácido caprílico, cáprico e láurico este assunto tem tomado espaço no que se refere à investigação do método que apresente o melhor rendimento nos produtos de interesse.

A literatura não contém muitas informações de síntese destes glicerídeos se restringindo em particular a métodos de glicerólise ou transesterificação de substratos que contenham significativos percentuais destes ácidos (RAHMAN et al., 2015; OH et al., 2009; ZHOU et al., 2001). A esterificação direta do glicerol com o ácido graxo possui menos informações que os outros métodos, porém, este possui a vantagem de exigir menos etapas de purificação que os outros métodos.

Conforme consta na literatura, a temperatura usada para a reação está em torno de 40 e 60 °C para ampla variedade de enzimas. Esta condição é considerada com o objetivo de aumentar a constante de Arrhenius da reação ao máximo sem prejudicar a atividade da enzima. Para este trabalho a temperatura do meio reacional, foi mantida em 60 °C como a máxima temperatura que não prejudique a estrutura da enzima.

O ajuste da velocidade de agitação levou em conta a mínima rotação necessária para que o sistema composto de duas fases tivesse a maior mistura possível com a completa suspensão do catalisador no interior do meio reacional utilizando um impelidor do tipo propeler.

Devido ao fato de que a monocaprilina é empregada em formulações farmacêuticas de aplicação cutânea, optou-se por testar as reações na ausência de solventes eliminando a etapa adicional de eliminação destes no produto final.

Segundo Sánchez et al (2014), sendo glicerol um subproduto de baixo custo da indústria do biodiesel, o uso deste como um substrato é eficiente em termos econômicos. Além disso, a reação de esterificação com substratos simples, tais como o glicerol e o ácido caprílico, a complexidade do meio de reação e aspectos analíticos se tornam reduzidos se comparado aos ensaios realizados com substratos complexos tal como são os óleos e gorduras submetidos a reações de glicerólise.

A distribuição dos produtos reacionais da esterificação em MAG, DAG e TAG foram realizadas por cromatografia a gás conforme descrito pelo método Cd 11b-91 de propriedade da *American Oil Chemists' Society* (AOCS). Conforme descrito no referido método, o cromatógrafo usado possui injetor do tipo *on column* e a separação é feita em rampa de temperatura que alcança até 360 °C. Porém, nem sempre é possível a reprodução destas condições em equipamentos os quais possuam uso diversificado, como o caso do equipamento utilizado neste trabalho. Contudo, esta condição não impediu que fosse realizada a análise. Conforme recomendações do mesmo método, para poder utilizar o sistema de injeção do tipo *split* e condições brandas de temperatura (em torno de 320 °C) o método descreve que anteriormente à quantificação dos produtos deverão ser feitas curvas de calibração específicas para cada composto de interesse a ser identificado testando principalmente o ajuste linear do método.

O resumo dos resultados obtidos pelas curvas de calibração realizada através a metodologia descrita por este trabalho estão expostos na Tabela 18:

Tabela 18. Coeficientes de correlação obtidos na calibração do método de acordo com o método Cd 11b-91 da AOCS adaptada.

Substância	Tempo de Retenção (min)	R²
Ácido caprílico	9,7	0,9995
Monocaprilina	14,65	0,9989
n-Tetradecano ¹	10,87	-
Dilaurina ²	23,6	0,9976
Tricaprilina	21,6	0,9962

¹ Padrão interno (PI);

² Substância usada como padrão externo de calibração tomada como referência para a dicaprilina.

Conforme mencionado antes, como não se conseguiu adquirir o padrão de dicaprilina, a calibração foi feita de acordo com as respostas obtidas na calibração com dilaurina como padrão cromatográfico.

A Tabela 19 apresenta os resultados da esterificação do glicerol com ácido caprílico utilizando as enzimas Lipozyme RM IM e NSM-RM.

Tabela 19. Distribuição dos produtos da reação de esterificação de glicerol com ácido caprílico em diferentes razões molares realizada em batelada de 3 horas, temperatura do meio reacional de 60 °C e agitação mecânica de 800 rpm.

Enzima	Razão Glicerol/Ácido	Ácido Caprílico (%)	Monocaprilina* (%)	Dicaprilina* (%)	Tricaprilina (%)
RM IM	6:1	89,11	8,34	2,55	n.q.**
	3:1	97,84	1,80	0,36	n.q.
	1:1	91,13	5,46	3,41	n.q.
	1:3	89,57	6,84	3,59	n.q.
	1:6	91,90	6,00	2,10	n.q.
NSM RM	6:1	99,38	0,36	0,16	0,10
	3:1	99,59	0,32	0,03	0,06
	1:1	100,00	n.q.	n.q.	n.q.
	1:3	100,00	n.q.	n.q.	n.q.
	1:6	100,00	n.q.	n.q.	n.q.

* Mistura dos isômeros.

** Não quantificado.

Conforme pode ser observado, em relação à lipase comercial a conversão total do ácido caprílico utilizando a enzima comercial é insatisfatória não ultrapassando a faixa de 10 % (m/m). Quando usada a enzima imobilizada no suporte sintetizado os resultados são inferiores sequer apresentando conversão significativa em algumas condições reacionais.

A lipase RM (comercial e imobilizadas em NSM-SDS) não produziu em nenhum dos experimentos realizados quantidades significativas de tricaprilina. Este comportamento era esperado devido a esta enzima ser *sn*-1,3-específica.

Sánchez et al. (2014) obtiveram os maiores resultados de conversão de ácido cáprico em monocaprina (em média 18 % (m/m)) utilizando elevadas razões molares de glicerol/ácido em meio reacional sem solvente, utilizando Lipozyme RM IM como catalisador em um tempo reacional total de 6 horas. Em comparação com o presente estudo, a conversão em monocaprilina alcançou o máximo de produção de 8,34 % em massa no produto final. Para reações que utilizem lipase de RM a elevação nos rendimentos pode ser alcançada com o uso de estratégias tais como a adsorção prévia do glicerol em sílica gel como forma de minimizar o efeito inibitório exibido pelo glicerol (SÁNCHEZ et al., 2014) ou o uso de surfactantes e cossolventes que minimizam as barreiras difusivas entre a lipase e o substrato (PARK et al., 2016)

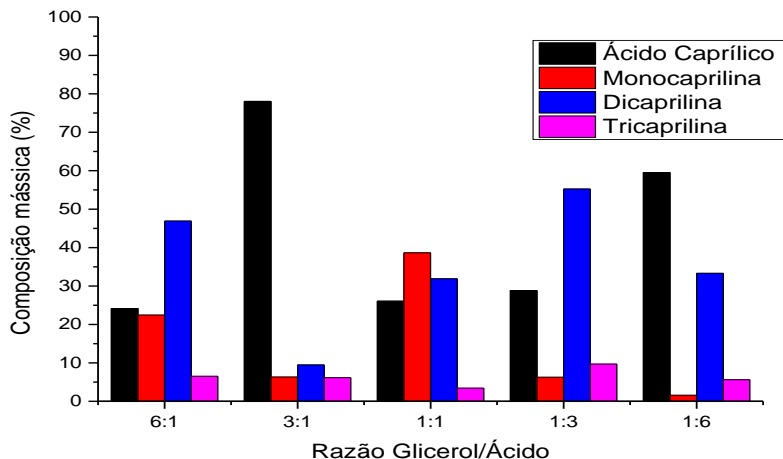
A Tabela 20 apresenta os resultados da esterificação do glicerol com ácido caprílico utilizando as enzimas Novozym 435 e NSM-CALB.

Tabela 20. Distribuição dos produtos da reação de esterificação de glicerol com ácido caprílico em diferentes razões molares realizada em batelada de 3 horas, temperatura do meio reacional de 60 °C e agitação mecânica de 800 rpm.

Enzima	Razão Glicerol/Ácido	Ácido Caprílico (%)	Monocaprilina* (%)	Dicaprilina* (%)	Tricaprilina (%)
Novozym 435	6:1	24,16	22,43	46,89	6,52
	3:1	78,05	6,33	9,46	6,16
	1:1	26,05	38,63	31,88	3,44
	1:3	28,82	6,26	55,24	9,68
	1:6	59,52	1,57	33,30	5,61
NSM-CALB	6:1	36,60	40,85	22,51	0,04
	3:1	77,96	22,04	n.q.	n.q.
	1:1	38,18	36,22	25,47	0,13
	1:3	87,28	10,41	2,21	0,10
	1:6	92,26	6,14	1,39	0,21

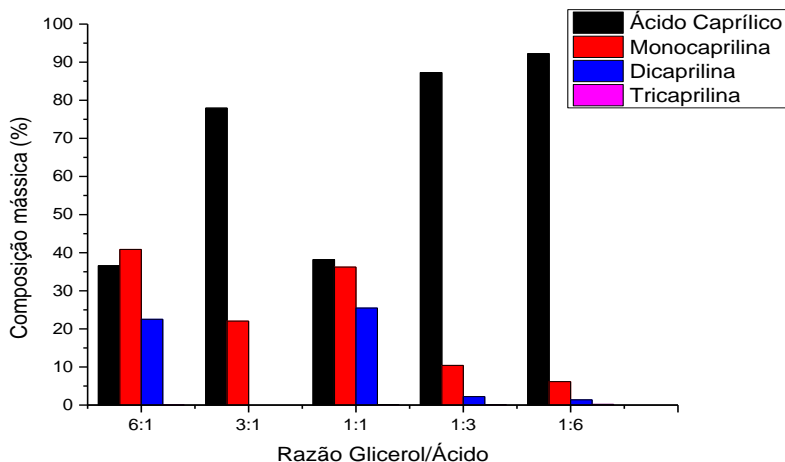
Os dados são mais bem visualizados na forma de histogramas. A distribuição dos produtos usando a lipase Novozym 435 está demonstrada no gráfico comparativo demonstrado na Figura 49:

Figura 49. Distribuição dos produtos obtidos pela esterificação direta do glicerol com o ácido caprílico em modo batelada com Novozym 435.



A distribuição dos produtos usando a enzima NSM-CALB está demonstrada no gráfico comparativo demonstrado na Figura 50:

Figura 50. Distribuição dos produtos obtidos pela esterificação direta do glicerol com o ácido caprílico em modo batelada com NSM-CALB.

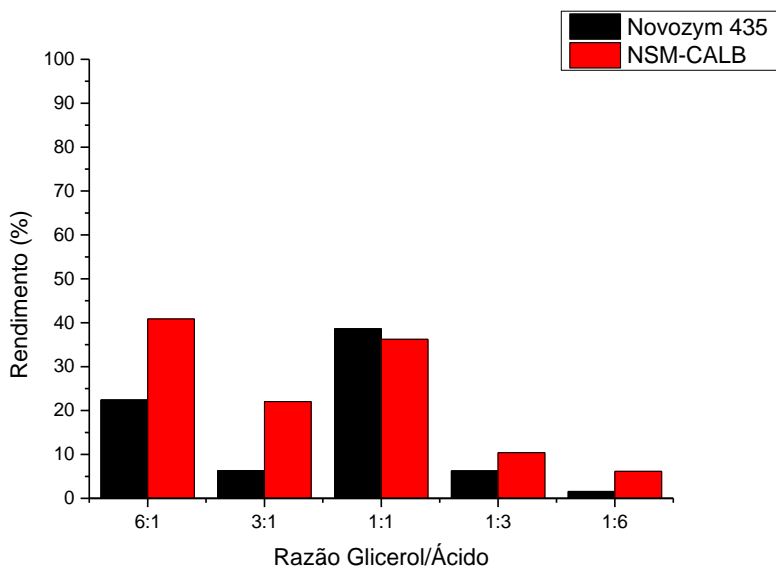


Levando em conta que a lipase CALB não é regioespecífica (NOVOZYMES, 2014), é prevista a formação direta de produtos de esterificação inclusive na posição 2 do glicerol.

Diante dos resultados obtidos é possível constatar a diferença de comportamento entre as enzimas. A lipase RM apresentou em todos os casos rendimentos inferiores aos obtidos com a lipase CALB. Para a lipase RM comercial o maior rendimento foi alcançado em condições as quais o glicerol estava em maior proporção molar (razão 6:1). O mesmo resultado foi observado para a lipase NSM-CALB. De acordo com Gofferjé et al (2014), este comportamento se deve ao fato de que o teor de glicerol no meio reacional é conhecido como sendo um parâmetro de importante no processo: por um lado certas quantidades de glicerol são necessárias para deslocar o equilíbrio da reação no sentido da esterificação, por outro lado o mesmo é conhecido por desativar as lipases.

A Figura 51 apresenta o histograma de comparação dos rendimentos em monocaprilina para as lipases Novozym 435 e NSM-CALB:

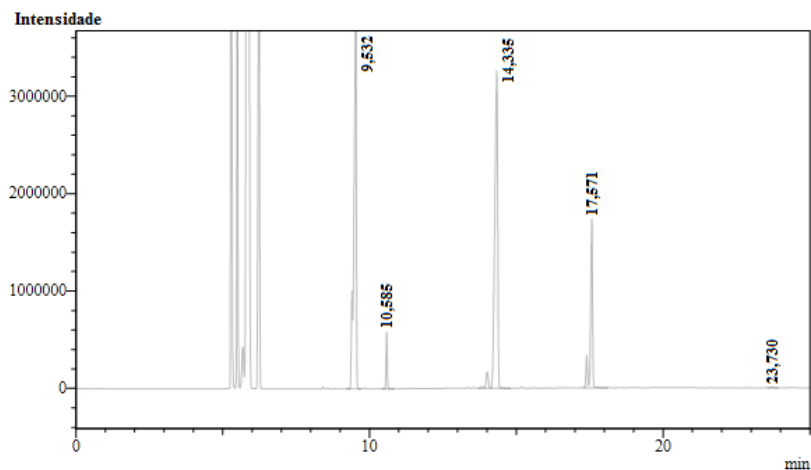
Figura 51. Comparativo na produção de monocaprilina para as lipases Novozym 435 e NSM-CALB.



De acordo com o gráfico acima é possível concluir que o melhor rendimento em monocaprilina alcançada pela metodologia utilizada neste trabalho utilizando enzimas imobilizadas no suporte também sintetizados neste trabalho foi à condição de razão molar glicerol/ácido de 6:1 com a lipase NSM-CALB. Estes resultados mostram inclusive que a lipase suportada em NSM-SDS apresentou melhores resultados do que a mesma disponível comercialmente para uma reação de esterificação direta entre glicerol e ácido caprílico.

A Figura 52 apresenta o cromatograma resultante da análise da amostra que apresentou o maior rendimento em monocaprilina de acordo com os experimentos realizados neste trabalho.

Figura 52. Cromatograma referente ao resultado do experimento de esterificação utilizando a lipase NSM-CALB na razão molar de glicerol/ácido de 6:1, temperatura de 60 °C com 5 % (m/m) de lipase imobilizada.



Condições de operação: Injetor a 320 °C, $T_{i\text{ coluna}} = 80\text{ °C}$, rampa de $20\text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$, $T_{f\text{ coluna}} = 330\text{ °C}$ com patamar por 15 min, detector à 350 °C, hélio como gás de arraste a $2\text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$.
Coluna: coluna capilar de sílica fundida com fase estacionária de 5% fenil – 95% dimetilpolisiloxano, $60\text{ m} \times 0,25\text{ mm}$; modelo RTX-5.

Considerando que no início o sistema continha somente ácido caprílico e glicerol como reagentes, e considerando que o método cromatográfico usado não tem a capacidade de quantificar o glicerol não reagido. A redução na concentração de ácido caprílico no produto final se dá pela conversão deste em mono, di e triacilgliceróis.

A quantificação feita para a monocaprilina e a dicaprilina leva em conta a soma dos dois picos que coeluem em tempos de retenção próximos os quais correspondem aos seus isômeros. A lipase RM é *sn*-1,3-específica, o que conduziria a reação para a formação de produtos substituídos somente nas posições 1 e 3 da molécula de glicerol, porém, conforme mostrado na Figura 16 o aparecimento de isômeros com substituição na posição dois se deve ao fato de ocorrer a migração de grupamentos acil no interior da molécula para a posição 2 devido aos efeitos produzidos por determinadas condições reacionais tais como temperatura do meio reacional ou a razão dos reagentes utilizada. Esta investigação não faz parte do escopo deste trabalho, porém, esta informação justifica o aparecimento de dois picos para cada substância, mesmo em reações utilizando enzimas regioespecíficas como a RM.

Os primeiros picos a aparecerem no cromatograma se referem à piridina e ao excesso dos reagentes utilizados como derivatizantes. O primeiro pico considerado é o de ácido caprílico que eluiu definido em torno de 9,734 minutos, o pico do padrão interno de n-tetradecano eluiu em 10,875 minutos, os dois picos dos isômeros de monocaprilina eluíram em torno de 14,656 minutos, os dois picos dos isômeros de dicaprilina eluíram em torno de 17,914 minutos e o último pico, referente a tricaprilina eluiu em 22,185 minutos. Com este cromatograma é possível verificar que o método foi adequado para a separação e nitidez dos picos de cada substância.

Em relação aos outros resultados obtidos, utilizando excesso de glicerol, como na reação com razão 6:1 também a lipase NSM-CALB. Com o aumento da razão de glicerol/ácido para 1:6 observa-se que a lipase NSM-CALB aumenta seu rendimento em di e tricaprilina reduzindo o rendimento em monocaprilina.

6 CONCLUSÕES

- De acordo com os resultados obtidos da síntese e caracterização das nanopartículas paramagnéticas de magnetita foi possível concluir que o uso do ultrassom durante a reação de coprecipitação provoca alterações nas partículas quanto a sua área superficial, estabilidade de suspensão e tamanho de partículas. O uso do ultrassom favoreceu as propriedades para o uso destas partículas como suporte para lipases.
- Além do ultrassom, foi constatado que o controle da velocidade de agitação mecânica é um parâmetro importante para a síntese de nanopartículas aplicáveis como suporte para enzimas. Neste trabalho a melhor condição obtida, de acordo com as propriedades medidas, foi a que utilizou agitação de 1200 rpm durante a reação de coprecipitação e substituição do oxalato por lauril sulfato.
- Os ensaios de estabilidade de suspensão e as micrografias de MEV mostraram que o suporte sintetizado apresenta elevado grau de aglomeração. As análises do potencial zeta das partículas comprovam que esta tendência vai ao encontro dos resultados encontrados, pois em todos os casos as partículas não apresentaram carga superficial suficiente para que estas se repelissem. Embora ocorra este elevado grau de aglomeração das nanopartículas, vale ressaltar que os suportes comerciais são compostos de partículas maiores nas quais as enzimas são adsorvidas, permitindo assim a formação de leitos fixos ou a fácil recuperação destas partículas mesmo em reações em meio suspenso.
- A análise de MET foi conclusiva para a caracterização do material classificando-o como nano, embora as micrografias de MEV e os resultados do tamanho de partícula mostrem o elevado estado de aglomeração que estas partículas se encontram. O resultado de MET mostrou que estas partículas possuem tamanho na faixa de 10 nm.
- Os ensaios realizados utilizando o suporte hidrofóbico de NSM-SDS, concentração fixa de lipase e variando-se o

pH da solução salina de NaCl a 0,2 M mostraram que a melhor condição de imobilização foi diferente para cada enzima. Neste trabalho a lipase RM imobilizou melhor com pH 7 e a lipase CALB em pH 5.

- Os difratogramas de Raios-X mostraram que o suporte sintetizado é composto majoritariamente por magnetita. A ausência de picos interferentes elimina a possibilidade da presença de hematita, indicando que o procedimento de síntese foi realizado adequadamente no que se refere à oxidação indesejável dos átomos de ferro II a ferro III durante a reação do coprecipitação.
- Os ensaios de magnetização comprovaram a natureza paramagnética das partículas sintetizadas. Tal constatação foi feita através da observação das curvas do perfil de magnetização e da comparação das constantes de saturação e coercividade conhecidas da magnetita pura com a das nanopartículas sintetizadas.
- As isotermas de adsorção mostram que embora haja bom ajuste com o modelo de monocamadas (modelo de Langmuir), o modelo de Freundlich também apresentou resultados que satisfazem os critérios de classificação das isotermas obtidas, ou seja, deve ser considerada a presença de poros irregulares que permitem a adsorção em múltiplas camadas. Esta constatação vai ao encontro do observado no ensaio de adsorção de N_2 para determinação da área superficial e volume dos poros do suporte. De acordo com a classificação da IUPAC, o perfil obtido para a isoterma de adsorção de N_2 se enquadra na classe dos suportes que permitem adsorção em multicamadas.
- A análise de infravermelho se mostrou uma técnica eficaz para a identificação qualitativa das substâncias adsorvidas no suporte sintetizado, bem como mostra claramente as diferenças entre o suporte modificado com o lauril sulfato em relação à magnetita pura. Foi possível detectar a presença do grupo oxalato e sua substituição pelo lauril sulfato através do deslocamento de bandas específicas para estas moléculas. Outro fator marcante nesta análise está relacionado ao comportamento observado em número específicos do espectro os quais se

referem às ligações peptídicas das proteínas que compõem as enzimas as regiões de Amida I e Amida II, evidenciando quais os picos que estão relacionados às ligações peptídicas das proteínas (lipases).

- Os ensaios de estabilidade realizados com as enzimas imobilizadas em contato com diferentes temperaturas e polaridades de solvente mostraram a sua variação de atividade em relação ao contato com o meio reacional. Nos ensaios com variação de temperatura utilizando isoctano como solvente, houve queda de cerca de 10 % na atividade de hidrólise inicial da lipase RM e uma queda um pouco mais acentuada para a lipase CALB, cerca de 50 % durante as duas horas de contato com o solvente. Em relação ao contato com solventes de diferentes polaridades à temperatura de 25 °C, ocorreu o efeito inverso. Quanto menor a polaridade do solvente maior foi a ativação da enzima no ensaio de hidrólise, sendo tal observação atribuída ao fato de que quanto mais polar for o solvente mais este retirará a água da lipase, diminuindo assim sua atividade.
- Os testes de reuso feitos com as lipases NSM-RM e NSM-CALB mostraram que mesmo após 16 ciclos consecutivos de reações de atividade hidrolítica, a perda de atividade das lipases foi pequena. Embora este ensaio seja rápido, expondo a enzima há um tempo relativamente curto de contato com o substrato, é importante observar que este método permite a realização de múltiplos ciclos de teste de atividade com o mínimo de perda de enzima imobilizada, produzindo resultados mais confiáveis do que aqueles que envolvem a retirada da enzima e titulação de sua atividade. Com o resultado obtido nestes ensaios verificou-se que as lipases estavam fortemente adsorvidas no suporte.
- Os ensaios de esterificação de glicerol com ácido caprílico apresentaram resultados bastante distintos para as enzimas estudadas. As lipases RM, tanto comercial (Lipozyme RM IM) quanto a imobilizada, apresentaram rendimentos bastante baixos e não se mostraram adequadas para a aplicação estudada, embora todos os resultados anteriores mostrassem que a mesma foi

imobilizada e possuiu boa atividade de hidrólise e esterificação. Neste caso, sugere-se como estudo a aplicação da mesma para outras reações. Os melhores resultados foram alcançados utilizando a enzima CALB em ambos os suportes, comercial e sintetizado. A lipase NSM-CALB na maioria das vezes apresentou melhor conversão que a sua forma comercial apresentando inclusive maior seletividade para a produção de monocaprilina, objeto de estudo neste exemplo de aplicação. A melhor condição alcançada para a aplicação da lipase NSM-CALB foi meio reacional à temperatura de 60 °C, agitação de 800 rpm, 5 % (m/m) de enzima em relação ao meio reacional e razão molar de 6:1 de glicerol/ácido caprílico.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudos de modificação da carga superficial do suporte e seu efeito na adsorção das lipases;
- Estudos da síntese das nanopartículas de NSM-SDS utilizando diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio para verificar o efeito de adições crescentes deste reagente na síntese das partículas;
- Investigação da aplicação das enzimas imobilizadas em suportes magnéticos contendo um surfactante na área de qualidade de alimentos para comprovar a sua segurança em processos alimentícios e farmacêuticos;
- Estudos de aumento dos rendimentos em glicérides através da reação de esterificação direta utilizando as enzimas imobilizadas neste trabalho, bem como testando outras que possuam distintas características;
- Realização de ensaios utilizando lipases imobilizadas em NSM-SDS na síntese de monocaprilina com o objetivo de aumentar o rendimento deste produto.

8 REFERÊNCIAS

AGUIEIRAS, E. C. G.; VELOSO, C. O.; BEVILAQUA, J. V.; ROSAS, D. O.; DA SILVA, M. A. P.; LANGONE, M. A. P. Estolides Synthesis Catalyzed by Immobilized Lipases. **Enzyme Research**.p. 7. 2011.

AKIL, E.; CARVALHO, T.; BÁREA, B.; FINOTELLI, P.; LECOMTE, J.; TORRES, A. G.; AMARAL, P.; VILLENEUVE, P. Accessing regio- and typo-selectivity of *Yarrowia lipolytica* lipase in its free form and immobilized onto magnetic nanoparticles. **Biochemical Engineering Journal**. p. 1-30. 2016.

ALBUQUERQUE, M. C. G.; CAVALCANTE JR. C. L.; TORRES, A. E.; AZEVEDO, D.; PARENTE JR. E. Transesterification of Castor Oil Using Ethanol: Effect of Water Removal by Adsorption onto Zeolite 3A. **Energy & Fuels**, 23. p. 1136-1138. 2009.

ALCÁNTARA, A. R.; FUENTES, I. E.; SINISTERRA, E. V. *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: an overview. **Chemistry and Physics of Lipids**, 93. p. 169–184. 1998.

ANDERSEN, S. L. F. Aplicação de óxidos de ferro produzidos a partir da drenagem ácida de mina na combustão catalítica de compostos orgânicos voláteis. **Tese de doutorado**. Florianópolis, p. 147. 2011.

AOCS. Determination of Mono- and Diglycerides by Capillary Gas Chromatography. In: **SOCIETY, A. O. C. AOCS Methods**. [S.l.]: [s.n.], v. Section C - Commercial fats and oils. p. 5. 2003.

APPLEBY, D. B. Glicerol. In: KNOTHE, G., et al. Manual de Biodiesel. [S.l.]: **Edgard Blucher**. Cap. 11, p. 340. 2006.

ARIOVOLI, S.; THENKUZHALI, M. Kinetic, Mechanistic, Thermodynamic and Equilibrium Studies on the Adsorption of Rhodamine B by Acid Activated Low Cost Carbon. **E-Journal of Chemistry**, 5. p. 187-200. 2008.

ATACAN, K.; ÖZACAR, M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 128. p. 227–236. 2015.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; BERENGUER-MURCIA, A.; RODRIGUES R.C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Heterofunctional supports in enzyme immobilization: From traditional immobilization protocols to opportunities in tuning enzyme properties. **Biomacromolecules**, 14. p. 2433–2462. 2013.

BARBOSA, O.; TORRES, R.; ORTIZ, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effect of immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, 47. p. 1220-1227. 2012.

BARBOSA, L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. Viçosa: UFV, 2007.

BEDÊ, P. M. Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para aplicações biomédicas. **Dissertação de mestrado**. Rio de Janeiro, p. 73. 2010.

BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Biochemical Engineering. Boca Raton: **Taylor & Francis Group**, 1997.

BLANCO, R. M.; GUISÁN, J. M. Stabilization of enzymes by multipoint covalent attachment to agarose-aldehyde gels. Borohydride reduction of trypsin-agarose derivatives. **Enzyme Microb. Technol.**, 11.360-366. 1989.

BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, 72. p. 248-254. 1976.

BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Enzyme Immobilization Literature Survey. In: GUISAN, J. M. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells. [S.l.]: **Humana Press**, v. 22. p. 15-30. 2006.

CALERO, J.; LUNA, D.; SANCHO, E. D.; LUNA, C.; BAUTISTA, F. M.; ROMERO, A. A.; POSADILLO, A.; VERDUGO, C. Development of a new biodiesel that integrates glycerol, by using CaO as heterogeneous catalyst, in the partial methanolysis of sunflower oil. **Fuel**, 122. p. 94-102. 2014.

CANILHA, L.; DE CARVALHO, W.; SILVA, J. B. A. Biocatalisadores imobilizados: Uso de células e enzimas imobilizadas em processos biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento Ano IX**, 36. p. 10. 2006.

CAO, L. Carrier-bound Immobilized Enzymes. Weinheim: **WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA**, 2005.

CHAICHI, M. J.; EHSANI, M. A novel glucose sensor based on immobilization of glucose oxidase on the chitosan-coated Fe₃O₄ nanoparticles and the luminol-H₂O₂-gold nanoparticle chemiluminescence detection system. **Sensors and Actuators B**. p. 1-42. 2015.

CHAUBEY, A.; PARSHAD, R.; TANEJA, S. C.; QAZI, G. N. Arthrobacter sp. lipase immobilization on magnetic sol-gel composite supports for enantioselectivity improvement. **Process Biochemistry**, 44. p. 154-160. 2009.

CHEN, B.; MCCLEMENTS, D. J.; DECKER, E. A. Impact of diacylglycerol and monoacylglycerol on the physical and chemical properties of stripped soybean oil. **Food Chemistry**, 142. p. 365-372. 2014.

CHEN, Y. H. Thermal properties of nanocrystalline goethite, magnetite, and maghemite. **Journal of Alloys and Compounds**, 553. p. 194-198. 2013.

CHIOU, S. H.; WU, J. C. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**, 25. p. 197-204. 2004.

CHRISTIE, W. W. Monoacylglycerols: structure, composition, function and analysis. The AOCs Lipid Library, 18 Junho 2013. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Lipids/mg/file.pdf>>. Acesso em: 01 Fevereiro 2014.

CORNWELL, P. A.; TUBEK, J.; VAN GOMPEL, H. A. H. P.; LITTLE, C. J.; WIECHERS, J. W. Glycerol monocaprylate: caprate as a moderate skin penetration enhancer. **International Journal of Pharmaceutics**, 171. p. 243-255. 1998.

DAYRIT, C. S. Coconut oil in health and disease: Its and monolaurin's potential as cure for HIV/AIDS. **XXXVII Cocotech Meeting Chennai**. India: [s.n.]. p. 12. 2000.

DESTAILLATS, F.; CRUZ-HERNANDEZ, C.; NAGY, K.; DIONISI, F. Identification of monoacylglycerol regio-isomers by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 1217. p. 1543-1548. 2010.

DORS, G. Etanolise enzimática do óleo de palma visando à produção de biodiesel em sistema contínuo. **Tese de doutorado**. Florianópolis. p. 231. 2011.

DURDUREANU-ANGHELUTA, A.; IGNAT, M.; MAIER, S. S.; PRICOP, L.; COROABA, A.; FIFERE, A.; PINTEALA, M.; CHIRIAC, A. Lipolytic biocatalyst based on recyclable magnetite-polysiloxanenaparticles. **Applied Surface Science**, 292,p. 898– 905. 2014.

ELDIN, M. S. M.; MITA, D. G. Immobilized Enzymes: Strategies for Overcoming the Substrate Diffusion Limitation Problem. **Current Biotechnology**, 3. p. 207-217. 2014.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 62. p. 197–212. 2010.

FONSECA, S. B. C. Aspectos técnicos e avaliação da metodologia para o acompanhamento da reação de glicerólise catalisada pelo derivado

enzimático Lipozyme TL. **Dissertação de mestrado**. Florianópolis, p. 90. 2015.

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**, 256. p. 1624-1635. 2010.

FREEDMAN, B.; KWOLEK, W. F.; PRYDE, E. H. Quantitation in the Analysis of Transesterified Soybean Oil by Capillary Gas Chromatography. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, 63. p. 1370-1375. 1986.

FREITAS, L.; SANTOS, J. C.; BARCZA, M. V.; DE CASTRO, H. F. Alternativa potencial para o aproveitamento do glicerol gerado na produção de biodiesel: Síntese enzimática de monolaurina por esterificação. **Quim.Nova**, 32. p. 2277-2281. 2009.

FREITAS, L.; DA RÓS, P. C. M.; SANTOS, J. C.; DE CASTRO, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya sp*). **Process Biochemistry**, 44. p. 1068–1074. 2009.

GAO, R.; HAO, Y.; ZHANG, L.; CUI, X.; LIU, D.; ZHANG, M.; TANG, Y.; ZHENG, Y. A facile method for protein imprinting on directly carboxyl-functionalized magnetic nanoparticles using non-covalent template immobilization strategy. **Chemical Engineering Journal**. p. 1-47. 2015.

GANJALIKHANY, M. H.; RANJBAR, B.; TAGHAVI, A. H.; MOGHADAM, T. T. Functional Motions of *Candida antarctica* Lipase B: A Survey through Open-Close Conformations. **Plos One**, 7. p. 1-11. 2012.

GAYOT, S.; SANTARELLI, X.; COULON, D. Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. **Journal of Biotechnology**, 101. p. 29-36. 2003.

- GHASEMI, S.; HEIDARY, M.; FARAMARZI, M. A.; HABIBI, Z. Immobilization of lipase on Fe₃O₄/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 100. p. 121–128. 2014.
- GOFFERJÉ, G.; STÄBLER, A.; HERFELLNER, T.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; FLÖTER, E. Kinetics of enzymatic esterification of glycerol and free fatty acids include Jatropha oil by immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 107. p. 1-7. 2014.
- GUNCHEVA, M.; DIMITROV, M.; ZHIRYAKOVA, D. Novel nanostructured tin dioxide as promising carrier for *Candida rugosa* lipase. **Process Biochemistry**, 46. p. 2170-2177. 2011.
- GUSTAFSSON, H.; JOHANSSON, E. M.; BARRABINO, A.; ODÉN, M.; HOLMBERG, K. Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica — The effect of varied particle size and morphology. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 100. p. 22-30. 2012.
- HASENHUETTL, G. L.; HARTEL, R. W. Food Emulsifiers and Their Applications. [S.l.]: **Springer Science+Business Media**, LLC, v. II. 443 p. 2008.
- HE, F.; ZHANG, S.; LIU, X. Immobilization of feruloyl esterases on magnetic nanoparticles and its potential in production of ferulic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 120. p. 330e334, 2015.
- HENRIQUES, R. O. Aspectos operacionais da etanolise enzimática do óleo de palma em reator de leito fixo. **Dissertação de mestrado**. Florianópolis, p. 89. 2012.
- HOUSAINDOKHT, M. R.; MONHEMI, H. The open lid conformation of the lipase is explored in the compressed gas: New insights from molecular dynamic simulation. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 87. p. 135-138. 2013.

JAIN, D.; MISHRA, S. Multifunctional solvent stable *Bacillus* lipase mediated biotransformations in the context of food and fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. p. 1-52. 2015.

JUN, C.; JEON, B. W.; JOO, J. C.; LE, Q. A. T.; GU, S. -A.; BYUN, S.; CHO, D. H.; KIM, D.; SANG, B. -I.; KIM, Y. H. Thermostabilization of *Candida antarctica* lipase B by double immobilization: Adsorption on a macroporous polyacrylate carrier and R1 silaffin-mediated biosilicification. **Process Biochemistry**, 48. p. 1181-1187. 2013.

KAMAL, M. Z.; YEDAVALLI, P.; DESHMUKH, M. V.; RAO, N. M. Lipase in aqueous-polar organic solvents: Activity, structure, and stability. **Protein Science**, 22. p. 904-915. 2013.

KHOABI, 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**. p. 1-10. 2014.

KHOOE, S.; SHANGHOLANI, H.; ABEDINI, N. Synthesis of quasi-spherical and square shaped oligoamino-ester graft-from magnetite nanoparticles: effect of morphology and chemical structure on protein interactions. **Polymer**. p. 1-33. 2015.

KIM, K. -H.; KIM, K. -B. Ultrasound assisted synthesis of nano-sized lithium cobalt oxide. **Ultrasonics Sonochemistry**, 15. p. 1019–1025. 2008.

KNOTHE, G. Introdução. In: KNOTHE, G., et al. Manual do Biodiesel. [S.l.]: **Edgard Blucher**. Cap. 1, p. 340. 2006.

KNOTHE, G. Métodos Analíticos para Biodiesel. In: KNOTHE, G., et al. Manual de Biodiesel. [S.l.]: **Edgard Blucher**. Cap. 5, p. 340. 2006.

KNOTHE, G. et al. Apêndice A - Tabelas Técnicas. In: KNOTHE, G., et al. Manual de Biodiesel. [S.l.]: **Edgard Blucher**. p. 340. 2006.

KRISHNA, S. H.; DIVAKAR, S.; PRAPULLA, S. G.; KARANTH, N. G. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. **Journal of Biotechnology**, 87. p. 193–201. 2001.

KUMAR, B.; SMITA, K.; CUMBAL, L.; DEBUT, A.; PATHAK, R. N. Sonochemical Synthesis of Silver Nanoparticles Using Starch: A Comparison. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, 2014. p. 1-8. 2014.

LEE, D.-G.; BAE, Y. -S.; TIE, S. -S.; KIM, M.; AHN, I. -S.; LEE, C. -H. Optimization of synthesizing leucine-binding nano-sized magnetite by a two-step transformation. **Korean J. Chem. Eng.**, 25. p. 144-148. 2008.

LEE, D.-G.; PONVEL, K. M.; KIM, M.; HWANG, S.; AHN, I. -S.; LEE, C. -H. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 57. p. 62-66. 2009.

LERCHE, D.; SOBICH, T. Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 440. p. 122– 130. 2014.

LI, C.; TAN, T.; ZHANG, H.; FENG, W. Analysis of the Conformational Stability and Activity of *Candida antarctica* Lipase B in Organic Solvents. **The Journal of Biological Chemistry**, 285. p. 28434-28441. 2010.

LI, S.-F.; FAN, Y. -H.; HU, R. -F.; WU, W. -T. Pseudomonas cepacia lipase immobilized onto the electrospun PAN nanofibrous membranes for biodiesel production from soybean oil. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 72. p. 40-45. 2011.

LI, Y.-S.; CHURCH, J. S.; WOODHEAD, A. L. Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, 324. p. 1543-1550. 2012.

LIMA, A. W. O.; ANGNES, L. Biocatálise em meios aquo-restritos: fundamentos e aplicações em química analítica. **Química Nova**, 22. p. 229-245. 1999.

MALAKPOUR, S.; MADANA, M. A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles. **Progress in Organic Coatings**, 86. p. 194–207. 2015.

MANAN, F. M. A.; RAHMAN, I. N. A.; MARZUKI, N. H. C.; MAHAT, N. A.; HUYOP, F.; WAHAB, R. A. Statistical modelling of eugenol benzoate synthesis using *Rhizomucor miehei* lipase reinforced nanobioconjugates. **Process Biochemistry**. p. 1-14. 2015.

MARTIN, A. E.; MURPHY, F. H. Glycols Propylene glycols. **The Dow Chemical Company**. [S.l.], p. 9. 2006.

MARTINEZ-GUERRA, E.; GUDE, V. G. Continuous and pulse sonication effects on transesterification of used vegetable oil. **Energy Conversion and Management**, 96. p. 268–276. 2015.

MASCOLO, M. C.; PEI, Y.; RING, T.A. Room Temperature Co-Precipitation Synthesis of Magnetite Nanoparticles in a Large pH Window with Different Bases. **Materials**, 6. p. 5549-5567. 2013.

MATEO, C.; PALOMO, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J. M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, 40. p. 1451–1463. 2007.

MATSUMOTO, M.; KIDA, K.; KONDO, K. Enhanced activities of lipase pretreated with organic solvents. **J. Chem. Technol. Biotechnol.**, 76. p. 1070-1073. 2001.

MENDES, A. A.; DE OLIVEIRA, P. C.; DE CASTRO, H. F.; GIORDANO, R. L. C. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova**, 34, n. 5. 831 - 840. 2011.

MENG, X.; XU, G.; ZHOU, Q. L.; WU, J. P.; YANG, L. R. Highly efficient solvent-free synthesis of 1,3-diacylglycerols by lipase immobilized on nano-sized magnetite particles. **Food Chemistry**, 143. p. 319-324. 2014.

MOHAPATRA, S.; ROUT, S. R.; PANDA, A. B. One-pot synthesis of uniform and spherically assembled functionalized MFe_2O_4 (M = Co, Mn, Ni) nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, 384. p. 453–460. 2011.

MOTEVALIZADEH, S. F.; KHOABI, M.; SADIGHI, A.; KHALILVAND-SEDAGHEH, M.; PAZHOUHANDEH, M.; RAMAZANI, A.; FARAMARZI, AM.A.; SHAFIEE, A. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. p. 1–29. 2015.

MUNIZ, C. A. S. Novas formulações de fluidos de corte: otimização, propriedades e recuperação do óleo usado. **Tese de doutorado**. Natal.p. 188. 2008.

MURTY, V. R.; BHAT, J.; MUNISWARAN, P. K. A. Hydrolysis of Oils by Using Immobilized Lipase Enzyme: A Review. **Biotechnol. Bioprocess Eng.**, 7. p. 57-66. 2002.

NAIR, M. K. M.; JOY, J.; VASUDEVAN, P.; HINCKLEY, L.; HOAGLAND, T. A.; VENKITANARAYANAN, K. S. Antibacterial Effect of Caprylic Acid and Monocaprylin on Major Bacterial Mastitis Pathogens. **Journal of Dairy Science**, 88. p. 3488–3495. 2005.

NETTO, C. G. C. M.; TOMA, H. E.; ANDRADE, L. H. Superparamagnetic nanoparticles as versatile carriers and supporting materials for enzymes. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 85 - 86. p. 71 - 92. 2013.

NEVES, A. L. P. Preparação e caracterização de nanopartículas de quitosana incorporadas com zinco com potencial atividade cicatrizante e antimicrobiana. **Tese de doutorado**. Florianópolis. p. 150. 2013.

NOVOZYMES. Enzymes for biocatalysis for smarter chemical synthesis. **Bagsvaerd**. p. 71 - 92. 2014.

OH, J. -E.; LEE, K. -W.; PARK, K. -H.; KIM, J. -Y.; KWON, K. -I.; KIM, J. -W.; KIM, H. -R.; KIM, I. -H. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Olive Oil with Capric Acid: Effect of Water Activity on Incorporation and Acyl Migration. **J. Agric. Food Chem.**, 57. p. 9280–9283. 2009.

ORATA, F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. In: MOHD, M. A. *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. [S.l.]: [s.n.]. Cap. 5, p. 83-108. 2012.

OZYILMAZ, E. The effect of spacer arm on hydrolytic and synthetic activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on silica gel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 56. p. 231–236. 2009.

OZYILMAZ, E.; SAYIN, S.; ARSLAN, M.; YILMAZ, M. Improving catalytic hydrolysis reaction efficiency of sol–gel-encapsulated *Candida rugosa* lipase with magnetic beta-cyclodextrin nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 113. p. 182– 189. 2014.

OZYILMAZ, E.; BAYRAKCI, M.; YILMAZ, M. Improvement of catalytic activity of *Candida rugosa* lipase in the presence of calix[4]arene bearing iminodicarboxylic/phosphonic acid complexes modified iron oxide nanoparticles. **Bioorganic Chemistry**. p. 1– 35. 2015.

PALOMO, J. M.; MUÑOZ, G.; FENÁNDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUIZÁN, J. M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl–Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 19-20. p. 279-286. 2002.

PANKYA, S.; THANDAVAN, K.; SIVALINGAM, D.; SETHURAMAN, S.; KRISHNAH, U. M.; JEYAPRAKASH, B. G.; RAYAPPAN, J. B. B. Lipase immobilized on nanostructured cerium oxide thin film coated on transparent conducting oxide electrode for

butyryl sensing. **Materials Chemistry and Physics**, 137. p. 892-897. 2013.

PARK, K. -M.; LEE, J. -H.; HONG, S. C.; KWON, C. W.; JO, M.; CHOI, S. J.; KIM, K.; CHANG, P. -S. Selective production of 1-monocaprin by porcine livercarboxylesterase-catalyzed esterification: Its enzyme kinetics and catalytic performance. **Enzyme and Microbial Technology**, 82. p. 51-57. 2016.

PESELA, B. C. C.; BETANCOR, L.; LOPEZ-GALLEGO, F.; TORRES, R.; DELLAMORA-ORTIZ, G. M.; ALONSO-MORALES, N.; FUENTES, M.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; GUISÁN, J. M.; MATEO, C. Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. **Enzyme and Microbial Technology**, 37. p. 295-299. 2005.

PESELA, B. C. C.; FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R.; FUENTES, M.; VIÁN, A.; GARCÍA, J. L.; CARRASCOSA, A. V.; MATEO, C.; GUISÁN, J. M. Reversible immobilization of a thermophilic β -galactosidase via ionic adsorption on PEI-coated Sepabeads. **Enzyme and Microbial Technology**, 32. p. 369-374. 2003.

QU, H.; MA, H.; ZHOU, W.; O'CONNOR, C. J. In situ surface functionalization of magnetic nanoparticles with hydrophilic natural amino acids. **Inorganica Chimica Acta**, 389. p. 60-65. 2012.

RADZIUK, D.; GRIGORIEV, D.; ZHANG, W.; SU, D.; MÖHWALD, H.; SHCHUKIN, D. Ultrasound-Assisted Fusion of Preformed Gold Nanoparticles. **J. Phys. Chem. C**, 114. p. 1835-1843. 2010.

RAHMAN, H.; ANGGADIRENDA, K.; SITOMPUL, J. P.; GUSDINAR, T. Synthesis and characterization of 2-monoacylglycerols from Canarium oil (*Canarium indicum*). **Procedia Food Science**, 3. p. 162 - 173. 2015.

RAITA, M.; ARNTHONG, J.; CHAMPREDA, V.; LAOSIRIPOJANA, N. Modification of magnetic nanoparticle lipase designs for biodiesel production from palm oil. **Fuel Processing Technology**. p. 1-9. 2015.

REETZ, M. T.; ZONTA, A.; VIJAYAKRISHNA, V.; SHIMOSSEK, K. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, 134. p. 251–258. 1998.

REIS, P.; HOLMBERG, K.; WATZKE, H.; LESER, M. E.; MILLER, R. Lipases at interfaces: A review. **Advances in Colloid and Interface Science**, 147-148. p. 237-250. 2009.

REN, Y.; RIVERA, J. G.; HE, L.; KULKARNI, H.; L, D. –K.; MESSERSMITH, P. B. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. **BMC Biotechnology**, 11. p. 1472-6750. 2011.

RIOS, N. S. Estudo da imobilização da lipase do tipo B de *Candida antarctica* em silicato mesoporoso nanoestruturado (SBA-15) visando a aplicação em reações de elevado interesse industrial. **Dissertação de mestrado**. Fortaleza, p. 107. 2016.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 66. 15–32. 2010.

SAFARIFARD, V.; MORSALI, A. Applications of ultrasound to the synthesis of nanoscale metal-organic coordination polymers. **Coordination Chemistry Reviews**. p. 1-28. 2015.

SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; TANAKA, A.; OZAKI, S.; NAKANISHI, K. Analysis of Monoglyceride Synthetic Reaction in a Solvent-Free Two-Phase System Catalyzed by a Monoacylglycerol Lipase from *Pseudomonas sp.* LP7315. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 91. p. 88-90. 2001.

SAKIYAMA, T.; YOSHIMI, T.; MIYAKE, A.; UMEOKA, M.; TANAKA, A.; NAKANISHI, K. Purification and Characterization of a Monoacylglycerol Lipase from *Pseudomonas sp.* LP7315, 91. p. 27-32. 2001.

SALGIN, S.; SALGIN, U.; BAHADIR, S. Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths **Int. J. Electrochem. Sci.**, 7. p. 12404 - 12414. 2012.

SÁNCHEZ, D. A.; TONETTO, G. M.; FERREIRA, M. J. Enzymatic synthesis of 1,3-dicaproyglycerol by esterification of glycerol with capric acid in an organic solvent system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 100. p. 7-18. 2014.

SARTORATTO, P. P. C.; CAIADO, K. L.; PEDROZA, R. C.; DA SILVA, S. W.; MORAIS, P. C. The thermal stability of maghemite-silica nanocomposites: An investigation using X-ray diffraction and Raman spectroscopy. **Journal of Alloys and Compounds**, 434-435. p. 650-654. 2007.

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

SCHULTZ, N.; METREVELI, G.; FRANZREB, M.; FRIMMEL, F. H.; SYLDATK C. Zeta potential measurement as a diagnostic tool in enzyme immobilization **Colloids Surf. B** 66. p. 39–44. 2008.

SING, K. S. W.; EVERETT, D. H.; HAUL, R. A. W.; MOSCOU, L.; PIEROTTI, R. A.; ROUQUÉROL, J.; SIEMIENIEWSKA, T. Reporting physisorption data for gas/solid systems with Special Reference to the Determination of Surface Area and Porosity. **Pure & App. Chem**, 57.p. 603—619. 1985.

SINNIAH, S.; MOHAMAD, S.; MANAN, N. S. A. Magnetite Nanoparticles Coated with β -Cyclodextrin Functionalized-Ionic Liquid: Synthesis and Its Preliminary Investigation as a New Sensing Material. **Applied Surface Science**. p 1-23. 2015.

SUI, Y.; CUI, Y.; NIE, Y.; XIA, G. M.; SUN, G. X.; HAN, J. T. Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 93. p 24-28. 2012.

SUN, Y.-K.; MA, M.; ZHANG, Y.; GU, N. Synthesis of nanometer-size maghemite particles from magnetite. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 245.15-19. 2004.

SWARNALATHA, V.; ESTHER, R. A.; DHAMODHARAN, R. Immobilization of alpha-amylase on gum acacia stabilized magnetite nanoparticles, an easily recoverable and reusable support. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 96. p. 6-13. 2013.

SZABÓ, A.; KOTORMÁN, M.; LACZKÓ, I.; SIMON, L. M. Improved stability and catalytic activity of chemically modified papain in aqueous organic solvents. **Process Biochemistry**, 44. p. 199–204. 2009.

TALBERT, J. N.; GODDARD, J. M. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces. **Enzymes on material surfaces**, 93. p. 8-19. 2012.

TALEKAR, S.; GHODAKE, V.; GHOTAGE, T.; RATHOD, P.; DESHMUKH, P.; NADAR, S.; MULLA, M.; LADOLE, M. Novel magnetic cross-linked enzyme aggregates (magnetic CLEAs) of alpha amylase. **Bioresource Technology**, 123, p. 542-547. 2012.

TEJA, A.S.; KOH, P.Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Prog Cryst Growth Charact Mater**, 55, p. 22–45. 2009.

THORMAR, H.; HILMARSSON, H. Glycerol monocaprinate (monocaprin) reduces contamination by *Escherichia coli* and *Salmonella enteritidis* on hard surfaces. **Food Control**, 25. p. 505-510. 2012.

THÜNEMANN, A. F.; SHÜTT, D.; KAUFNER, L.; PISON, U.; MÖHWALD, H. Maghemite Nanoparticles Protectively Coated with Poly(ethyleneimine and Poly(ethylene oxide)-block-poly(glutamic acid). **Langmuir**, 22. p. 2351-2357. 2006.

TIE, S.-L.; LIN, Y. -Q.; LEE, H. -C.; BAE, Y. -S.; LEE, C. -H. Amino acid-coated nano-sized magnetite particles prepared by two-step transformation. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, 273. p. 75-83. 2006.

TUDORACHE, M.; NEGOI, A.; PROTESESCU, L.; PARVULESCU, V. I. Biocatalytic alternative for bio-glycerol conversion with alkyl carbonates via a lipase-linked magnetic nano-particles assisted process. **Applied Catalysis B: Environmental**, 145.p. 120-125, 2014.

UAUY-DAGACH, R.; VALENZUELA, A. Marine Oils: The Health Benefits of n-3 Fatty Acids. **Nutrition Reviews**, 54. p. 102-108. 1996.

VASCONCELLOS, A.; PAULA, A. S.; FILHO, R. A. L.; FARIAS, L. A.; GOMES, E.; ARANDA, D. A. G.; NERY, J. G. Synergistic effect in the catalytic activity of lipase *Rhizomucor miehei* immobilized on zeolites for the production of biodiesel. **Microporous and Mesoporous Materials**, 163. p. 343-355. 2012.

VERRI, F.; DIAZ, U.; MACARIO, A.; CORMA, A.; GIORDANO, G. Optimized hybrid nanospheres immobilizing *Rhizomucor miehei* lipase for chiral biotransformation. **Process Biochemistry**, p. 1-9. 2015.

VOLL, F.; KRÜGER, R. L.; DE CASTILHOS, F.; FILHO, L. C.; CABRAL, V.; NINOW, J.; CORAZZA, M. Kinetic modeling of lipase-catalyzed glycerolysis of olive oil. **Biochemical Engineering Journal**, 56, p. 107-115. 2011.

WANG, X.; JIN, Q.; WANG, T.; HUANG, J.; WANG, X. An improved method for the synthesis of 1-monoolein. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, 97. p. 130-136. 2013.

WU, W.; HE, Q.; JIANG, C. Application Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis and Surface Functionalization Strategies. **Nanoscale Res Lett**, 3. p. 397-415. 2008.

XU, J.; SUN, J.; WANG, Y.; SHENG, J.; WANG, F.; SUN, M. Application of Iron Magnetic Nanoparticles in Protein Immobilization. **Molecules**, 19. p. 11465-11486. 2014.

ZENEVICZ, M. C.; JACQUES, A.; FURIGO JR., A.; OLIVEIRA, J. V.; OLIVEIRA, D. Enzymatic hydrolysis of soybean and waste cooking oils under ultrasound system. **Industrial Crops and Products**. p. 1-7. 2015.

ZHOU, D.; XU, X.; MU, H.; HOY, C. E.; ADLER-NISSEN, J. Synthesis of Structured Triacylglycerols Containing Caproic Acid by Lipase-Catalyzed Acidolysis: Optimization by Response Surface Methodology. **J. Agric. Food Chem.**, 49 p. 5771-5777. 2001.

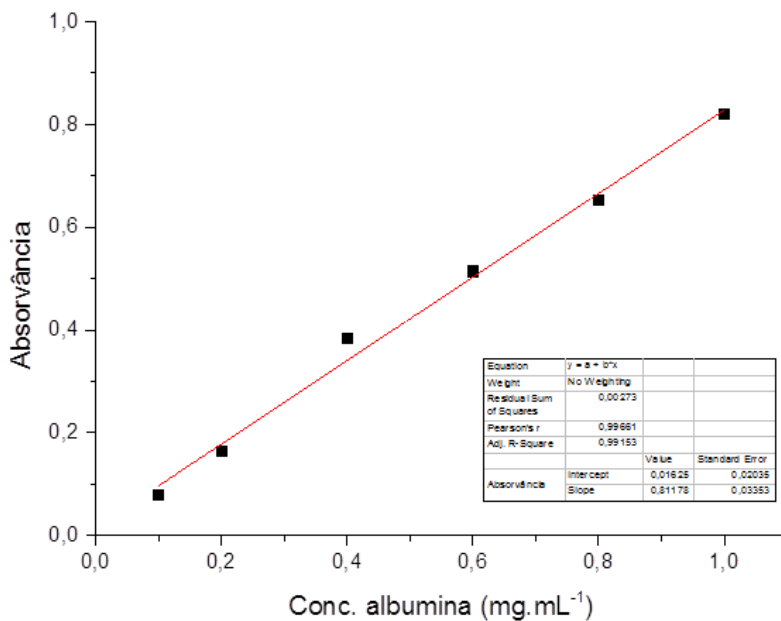
ZHU, Y. -T.; REN, X. -Y; LIU, Y. -M.; WEI, Y.; QING, L. S.; LIAO, X. Covalent immobilization of porcine pancreatic lipase on carboxyl-activated magnetic nanoparticles: Characterization and application for enzymatic inhibition assays. **Materials Science and Engineering C**, 38 p. 278-285. 2014.

APÊNDICE 1 – CURVA DE CALIBRAÇÃO para método de Bradford

Tabela 21. Curva de calibração de acordo com o método de Bradford para análise de proteínas.

Concentração de albumina (mg.mL ⁻¹)	Absorvância
0,1	0,08
0,2	0,164
0,4	0,384
0,6	0,514
0,8	0,652
1	0,82

Figura 53. Curva de calibração para o método de Bradford utilizando albumina bovina como proteína padrão.

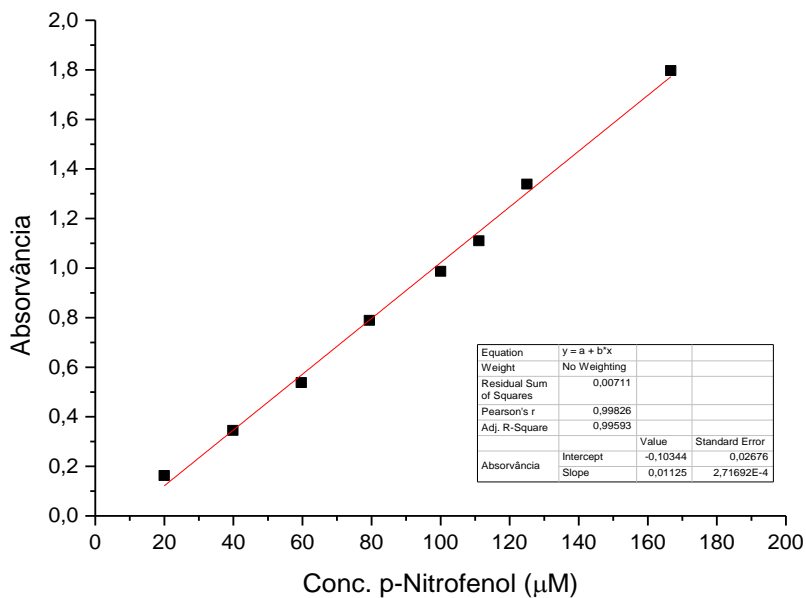


APÊNDICE 2 – CURVA DE CALIBRAÇÃO para atividade hidrolítica

Tabela 22. Valores de variação absorvância da solução p-nitrofenol em solução tampão fosfato 0,05 M com solução de Na_2CO_3 0,1 M (1:1; v/v).

Concentração de p-nitrofenol (M)	Absorvância
166,67	1,80
125,00	1,34
111,11	1,11
100,00	0,99
79,37	0,79
59,64	0,54
39,84	0,35
19,96	0,16

Figura 54. Curva de calibração para o método de atividade hidrolítica utilizando solução de p-nitrofenol como padrão.



APÊNDICE 3 – CURVAS DE CALIBRAÇÃO cromatográfica

Tabela 23. Curva de calibração do padrão de ácido caprílico utilizando padrão interno de n-tetradecano.

m P.I.	m P.E.	m P.E./ m P.I.	Área P.I.	Área P.E.	Área P.E./Área P.I.
0,0005	0,0002	0,3952	1003898,0	334135,0000	0,3328
0,0005	0,0005	0,8507	1095577,0	788008,0000	0,7193
0,0005	0,0006	1,2078	1409119,0	1517058,0000	1,0766
0,0005	0,0014	2,5163	1118233,0	2512459,0000	2,2468
0,0005	0,0032	5,9646	1066721,0	5987425,0000	5,6129

Tabela 24. Curva de calibração do padrão de monocaprilina utilizando padrão interno de n-tetradecano.

m P.I.	m P.E.	m P.E./ m P.I.	Área P.I.	Área P.E.	Área P.E./Área P.I.
0,0005	0,0069	12,8611	1005927,0	11405935,0	11,3387
0,0005	0,0001	0,2572	1104424,0	262687,0	0,2378
0,0005	0,0003	0,5144	1407225,0	432379,0	0,3073
0,0005	0,0007	1,2861	1106279,0	1200594,0	1,0853
0,0005	0,0014	2,7600	1048289,0	2255083,0	2,1512
0,0005	0,0035	6,4306	1010837,0	5637177,0	5,5767

Tabela 25. Curva de calibração do padrão de dilaurina utilizando padrão interno de n-tetradecano.

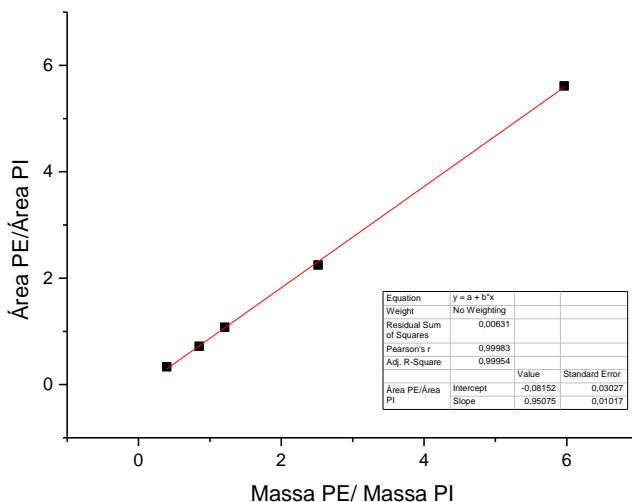
m P.I.	m P.E.	m P.E./ m P.I.	Área P.I.	Área P.E.	Área P.E./Área P.I.
0,0005	0,0069	12,8611	1005927,0		
0,0005	0,0001	0,2572	1104424,0	166363,0	0,1506
0,0005	0,0003	0,5144	1407225,0	294826,0	0,2095
0,0005	0,0007	1,2861	1106279,0	785562,0	0,7101
0,0005	0,0014	2,7600	1048289,0	1603196,0	1,5293
0,0005	0,0035	6,4306	1010837,0	3866003,0	3,8246

Tabela 26. Curva de calibração do padrão de tricaprilina utilizando padrão interno de n-tetradecano.

m P.I.	m P.E.	m P.E./ m P.I.	Área P.I.	Área P.E.	Área P.E./Área P.I.
0,0005	0,0215	40,0746	996858,0	16515622,0	16,5677
0,0005	0,0004	0,8015	793890,0	429272,0	0,5407
0,0005	0,0009	1,6030	960600,0	751698,0	0,7825
0,0005	0,0022	4,0075	853240,0	1882820,0	2,2067
0,0005	0,0043	8,6000	1155830,0	3558397,0	3,0787
0,0005	0,0108	20,0373	956978,0	7505759,0	7,8432

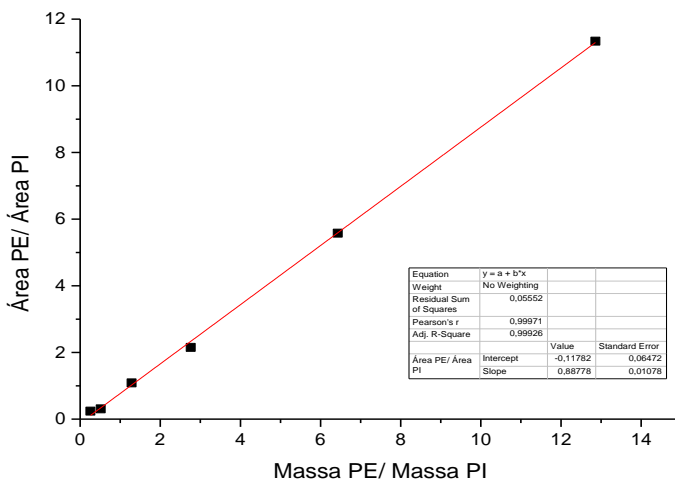
As curvas de calibração bem como sua equação da regressão linear e coeficiente de correlação estão descritos nas Figuras de 57 a 60:

Figura 55. Curva de calibração e ajuste linear para o ácido caprílico.



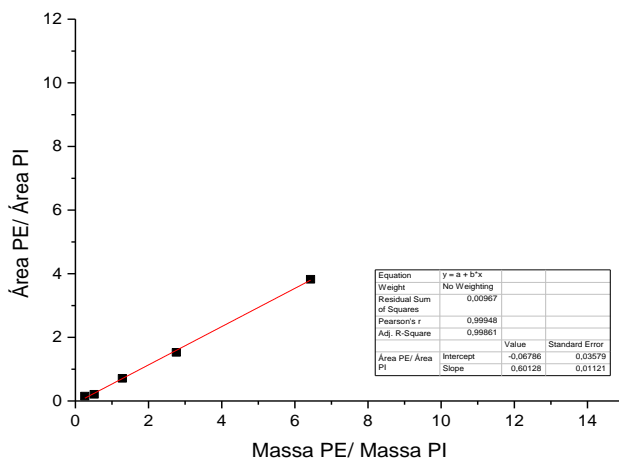
Massa PE., massa do padrão de ácido caprílico; Massa PI, massa do padrão interno (n-tetradecano); Área PE, área do pico correspondente ao ácido caprílico; Área PI, área do pico correspondente ao padrão interno (n-tetradecano).

Figura 56. Curva de calibração e ajuste linear para a monocaprilina.



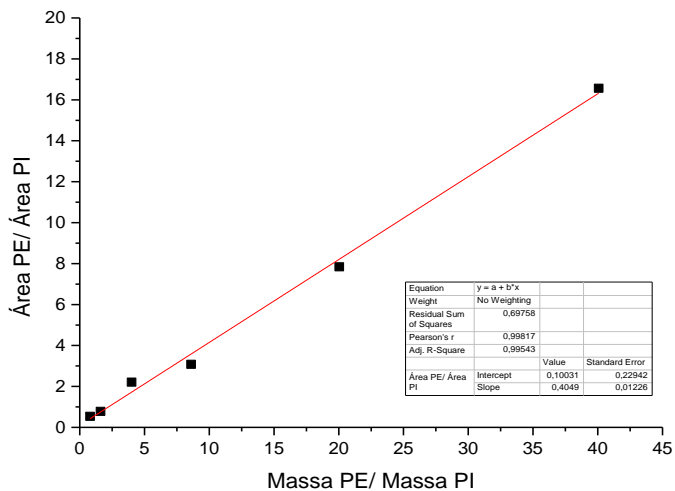
Massa PE., massa do padrão de monocaprilina; Massa PI, massa do padrão interno (n-tetradecano); Área PE, área do pico correspondente à monocaprilina; Área PI, área do pico correspondente ao padrão interno (n-tetradecano).

Figura 57. Curva de calibração e ajuste linear para a dilaurina.



Massa PE., massa do padrão de dilaurina; Massa PI, massa do padrão interno (n-tetradecano); Área PE, área do pico correspondente à dilaurina; Área PI, área do pico correspondente ao padrão interno (n-tetradecano).

Figura 58. Curva de calibração e ajuste linear para a tricaprilina.



Massa PE., massa do padrão de tricaprilina; Massa PI, massa do padrão interno (n-tetradecano); Área PE, área do pico correspondente à tricaprilina; Área PI, área do pico correspondente ao padrão interno (n-tetradecano).