

FERNANDA ZENDRON

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE NANOCOMPÓSITOS DE  
MAGNETITA-OXALATO COM LAURIL SULFATO DE SÓDIO  
PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

Florianópolis  
2018



FERNANDA ZENDRON

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE NANOCOMPÓSITOS DE  
MAGNETITA-OXALATO COM LAURIL SULFATO DE SÓDIO  
PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós-graduação em Engenharia Química  
da Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do Grau de  
Mestre em Engenharia Química

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Coorientadora: Dr<sup>a</sup>. Rosana Oliveira  
Henriques

Florianópolis  
2018

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

Zendron, Fernanda

Modificação superficial de nanocompósitos de magnetita-oxalato com lauril sulfato de sódio para imobilização de lipases / Fernanda Zendron ; orientador, Agenor Furigo Júnior, coorientadora, Rosana Oliveira Henriques, 2018.

86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Imobilização enzimática. 3. Nanopartículas magnéticas. 4. Lipase. 5. Lauril sulfato de sódio. I. Furigo Júnior, Agenor. II. Henriques, Rosana Oliveira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

Fernanda Zendron

**MODIFICAÇÃO SUPERFICIAL DE NANOCOMPÓSITOS DE  
MAGNETITA-OXALATO COM LAURIL SULFATO DE SÓDIO  
PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASES**

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de  
“mestre” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-  
graduação em Engenharia Química.

Florianópolis, 11 de dezembro de 2018.

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cíntia Soares  
Coordenadora do Curso

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

---

Dr<sup>a</sup>. Rosana de Oliveira Henriques

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Dr<sup>a</sup>. Denise Esteves Moritz  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Rafael Gonçalves de Souza  
Instituto Federal Catarinense



Este trabalho é dedicado à minha  
família e aos meus pais



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à paciência do meu marido Jean pela compreensão e pelo apoio durante esses anos de dedicação.

Aos meus pais, principalmente a minha mãe Beate, por me apoiarem incondicionalmente e me ajudarem com meus filhos, enquanto eu estava fora de casa me dedicando as disciplinas, aos experimentos e a dissertação e também por viajarem comigo e passarem o dia na UFSC com minha filha recém-nascida enquanto eu fazia as análises necessárias.

Aos meus colegas de EngeBio pela compreensão e pela amabilidade todas as vezes que eu solicitava ajuda.

Ao IFC por disponibilizar a oportunidade do afastamento parcial por 3 meses, tempo essencial ao qual pude me dedicar aos meus experimentos.

Aos meus colegas do IFC, em especial à Cássia, pelo carinho e pelo apoio, principalmente naqueles dias mais nebulosos, em meio a aulas, provas, reuniões, prazos, filhos pequenos, família, casa e mestrado, quando o sentimento de “não vou conseguir dar conta” começava a surgir, suas palavras de incentivo me ajudaram profundamente a seguir em frente com a certeza de que tudo daria certo.

Ao meu orientador Agenor, umas das pessoas mais compreensíveis e calmas que conheci sempre a disposição para me auxiliar nos momentos cruciais.

A minha colega de pesquisa e co-orientadora Rosana Henriques, que esteve presente desde o começo, sempre me auxiliando, explicando, me dando as orientações práticas. Agradeço profundamente à paciência e ao apoio.

A todos os professores que fizeram parte dessa longa caminhada, e por todo conhecimento adquirido.

Ao Departamento de Engenharia Química pela estrutura e apoio, necessários para concluir essa jornada.



*“O período de maior ganho em conhecimento e experiência,  
é o período mais difícil da vida de alguém.”*

*Dalai Lama*



## RESUMO

O uso de nanopartículas magnéticas têm sido amplamente explorado e estudado no ramo da biotecnologia. Elas apresentam como características um tamanho reduzido de partículas, grande área superficial, fácil separação e biocompatibilidade, além de serem atóxicas e poderem ser utilizadas em diversas áreas – desde a medicina até a engenharia bioquímica - como em imobilização enzimática. Neste trabalho foi estudado um suporte sintetizado a partir de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$ , originando nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{SO}_4$ ) funcionalizadas com oxalato de amônio. Esse suporte foi, posteriormente, modificado superficialmente com lauril sulfato de sódio (SDS), um surfactante, gerando assim um suporte com características hidrofóbicas, aplicado para imobilização de lipases. Foram estudados cinco tipos diferentes de tratamentos para suportes magnéticos, cada um deles com quantidades diferentes de SDS, com o objetivo de avaliar o efeito desta quantidade sobre a funcionalização e imobilização de lipases. Os suportes foram caracterizados através de espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier e magnetização de amostra vibrante. Esses suportes foram utilizados para imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*, acompanhando a imobilização através da determinação do teor de proteínas no preparado enzimático e no sobrenadante pelo método de Bradford e da atividade hidrolítica pela reação de hidrólise com o *p*-NPB. Após as análises, foi possível concluir que a TLL foi imobilizada em todos os suportes estudados e que ocorreu a troca do grupo oxalato pelo grupo lauril sulfato, tornando todos os suportes com as características desejadas. Foi possível perceber que há uma quantidade ideal de SDS durante a reação de modificação superficial, sendo as razões molares NPM:SDS de 5:1 e 10:1 as que apresentaram melhores resultados quanto à imobilização da lipase e quanto à atividade hidrolítica. Todos os suportes estudados apresentaram atividades hidrolíticas superiores à enzima livre.

**Palavras-chave:** Imobilização; nanopartículas magnéticas; magnetita; lipase; lauril sulfato de sódio.



## ABSTRACT

The use of magnetic nanoparticles has been widely explored and studied in the field of biotechnology. They have as characteristics a reduced particle size, large surface area, easy separation and biocompatibility, besides being non-toxic and can be used in several areas - from medicine to biochemical engineering - and in enzymatic immobilization. In this work a support synthesized from Fe<sup>+2</sup> and Fe<sup>+3</sup> was studied, resulting in magnetite nanoparticles (Fe<sub>3</sub>SO<sub>4</sub>) functionalized with ammonium oxalate. This support was subsequently modified superficially with sodium lauryl sulfate (SDS), a surfactant, thus generating a support with hydrophobic characteristics, applied for immobilization of lipases. Five different types of treatments for magnetic media, each with different amounts of SDS, were studied in order to evaluate the effect of this amount on functionalization and immobilization of lipases. The supports were characterized by Fourier transform infrared absorption spectroscopy and vibrating sample magnetization. These supports were used for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase, following immobilization by determination of the protein content in the enzyme preparation and in the supernatant by the Bradford method and hydrolytic activity by the hydrolysis reaction with the p-NPB. After the analysis, it was possible to conclude that the TLL was immobilized in all supports studied and that the oxalate group was replaced by the lauryl sulfate group, making all substrates with the desired characteristics. It was possible to observe that there is an ideal amount of SDS during the surface modification reaction, with NPM: SDS molar ratios of 5: 1 and 10: 1 being the best results for lipase immobilization and hydrolytic activity. All substrates studied presented hydrolytic activities superior to the free enzyme.

**Keywords:** Immobilization; magnetic nanoparticles; magnetite; lipase. sodium lauryl sulfate.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Orientações de momentos magnéticos e suas respectivas curvas de histerese magnética esperada para diferentes comportamentos magnéticos como: de (a) materiais paramagnéticos, (b) materiais ferromagnéticos e (c) materiais superparamagnéticos. ....	36
Figura 2- Exemplos de reações catalisadas por lipases .....	40
Figura 3 - Mecanismo de catálise da lipase.....	42
Figura 4 - Esquema da estrutura da TLL.....	43
Figura 5– Alguns métodos de imobilização enzimática.....	45
Figura 6 - Ativação interfacial da lipase em estruturas hidrofóbicas. ...	48
Figura 7 – Modificação superficial da NPM em duas etapas. ....	49
Figura 8 – Fórmula estrutural do lauril sulfato de sódio .....	50
Figura 9– Modificação superficial o de NPM-SDS em duas etapas conforme Lee et al (2009). ....	51
Figura 10 - Curvas de magnetização dos suportes de NPM-OX:SDS...	61
Figura 11– Espectro de FTIR dos suportes de NPM modificadas superficialmente com SDS com razões molares 1:1, 5:1 e 10:1. ....	63
Figura 12– Espectro de FTIR suportes modificados superficialmente com SDS com razões molares 15:1, 20:1 e NPM-OX. ....	63
Figura 13 - Concentração de proteínas (mg/mL) no sobrenadante em função do tempo de imobilização.....	65
Figura 14 - Atividade hidrolítica (U/L) do sobrenadante em função do tempo de imobilização. ....	67
Figura 15 - Atividade hidrolítica enzimática do sobrenadante antes da imobilização e após (180 min) a imobilização. ....	68
Figura 16 – Rendimento teórico de imobilização da atividade e rendimento efetivo de imobilização de proteínas nos suportes NPM-SDS. ....	69



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Aplicações industriais de lipases microbianas.....	41
Tabela 2 – Massas de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com oxalato (NPM-OX) e lauril sulfato de sódio (SDS) utilizadas para a síntese dos suportes estudados em 80 mL de água.....	54
Tabela 3– Valores de coercividade ( $H_c$ ), magnetização remanente ( $M_r$ ) e magnetização de saturação ( $M_s$ ) para todos os suportes.....	60
Tabela 4 – Quantidade de proteínas adsorvidas nos diferentes suportes sintetizados à temperatura ambiente, 300 rpm, 3,5 h de reação e volume reacional de 10 mL de solução.....	66
Tabela 5 - Atividade hidrolítica do derivado enzimático (U/L), atividade hidrolítica total do derivado enzimático (U) e atividade hidrolítica específica do derivado enzimático (U/mg) para cada suporte. ....	70
Tabela 6– Atividade Recuperada para cada suporte.....	72



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLEAs	<i>cross-linked enzyme aggregates</i>
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
MAV	Magnetização de amostra vibrante
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
NPM	Nanopartículas magnéticas
NPM-OX	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com oxalato de amônio
NPM-SDS	Nanopartículas magnéticas funcionalizadas com lauril sulfato de sódio.
NPM-TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> imobilizada na NPM
<i>p</i> -NPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -nitrofenol.
SDS	Lauril sulfato de sódio
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>



## LISTA DE SÍMBOLOS

$A_b$	Absorbância
$A_h$	Atividade hidrolítica do derivado enzimático (U/mL);
$A_{h,e}$	Atividade hidrolítica específica do derivado enzimático (U/g)
$A_{h,f}$	Atividade enzimática de hidrólise total do sobrenadante ao final da imobilização (U)
$A_{h,i}$	Atividade enzimática total de hidrólise do sobrenadante no início da imobilização (U)
$A_{h,t}$	Atividade hidrolítica total do derivado enzimático (U)
AR	Atividade recuperada (%)
$c$	Caminho óptico (1 cm);
$C_p$	Concentração de proteínas (mg/mL)
$f_d$	Fator de diluição da amostra (127 mL)
Hc	Coercividade
$m_{p,t}$	Massa de proteína imobilizada no derivado enzimático (mg)
Mr	Magnetização remanente
Ms	Magnetização de saturação
RI	Rendimento teórico da imobilização da atividade enzimática de hidrólise (%)
$V_r$	Volume do meio reacional (mL)
$\varepsilon$	Coefficiente de extinção molar do produto [15,15 $\mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ ]
$\sigma$	Coefficiente angular da reta absorbância X tempo ( $\text{min}^{-1}$ )



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>27</b>
<b>1.1 OBJETIVOS</b> .....	<b>31</b>
Objetivo geral.....	31
Objetivos específicos.....	31
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>33</b>
<b>2.1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS</b> .....	<b>33</b>
2.1.1. Propriedades magnéticas e características das NPMs .....	34
2.1.2. Síntese de nanopartículas magnéticas .....	37
<b>2.2. ENZIMAS</b> .....	<b>38</b>
2.2.1. Lipases.....	38
2.2.2 Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> .....	43
<b>2.3 IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA</b> .....	<b>44</b>
2.3.1 Modificações superficiais de nanopartículas magnéticas para imobilização de lipases.....	48
2.3.2. Modificação superficial de NPM com SDS .....	49
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
<b>3.1. MATERIAIS</b> .....	<b>53</b>
<b>3.2. MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
3.2.1 Síntese de NPM-OX.....	53
3.2.2. Síntese NPM-SDS .....	53
3.2.3. Determinação das propriedades magnéticas.....	54
3.2.4. Determinação da composição química.....	55
3.2.5. Imobilização da TLL no suporte NPM-SDS .....	55
3.2.6. Teor de proteínas do preparado enzimático comercial TLL.....	55
3.2.7. Determinação de atividade hidrolítica da lipase.....	56
3.2.8. Atividade específica do derivado enzimático.....	57

3.2.9. Rendimento da imobilização.....	57
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>59</b>
<b>4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPM-OX) PRODUZIDAS E MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE COM SDS.....</b>	<b>59</b>
4.1.1. Propriedades magnéticas do suporte NPM-SDS.....	60
4.1.2. Identificação de grupos funcionais nos suportes NPM-SDS.....	62
<b>4.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS TLL NOS SUPORTES NPM- SDS.....</b>	<b>64</b>
<b>4.3. CINÉTICA E RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA .....</b>	<b>67</b>
<b>4.4. ATIVIDADE HIDROLÍTICA DOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS.....</b>	<b>70</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A nanociência é uma das mais importantes áreas de estudo da ciência moderna. O uso de materiais nanoparticulados oferece muitas vantagens devido ao seu tamanho exclusivo e as suas propriedades físicas (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010). De acordo com os estudos feitos por Miao et al (2018) e Netto, Toma e Andrade (2013) nanopartículas magnéticas (NPMs) são um novo tipo de material que apresentam características como reduzido tamanho de partícula, grande área superficial de funcionalização, alta força coercitiva, forte capacidade de adsorção de superfície e baixa toxicidade. Adicionalmente, este tipo de material pode ser facilmente recuperado do meio reacional por meio da aplicação de um campo magnético externo, e juntamente com as características citadas acima, esse material é bastante promissor, caracterizando ótimas qualidades para um suporte catalítico. Dada as excelentes características estruturais das NPMs, estas podem ser eficientemente usadas como suporte para a imobilização de enzimas.

As enzimas são biocatalisadores naturais e são focos de diversas pesquisas na área de engenharia bioquímica. Elas possuem a capacidade de catalisar reações sob condições brandas de temperatura e pressão, com elevado grau de especificidade para com o substrato, reduzindo consideravelmente a formação de subprodutos (BRENA e BATISTA-VIEIRA, 2006). A capacidade das enzimas de catalisar reações em meio aquoso em condições moderadas minimiza também os efeitos de corrosão nos reatores e instrumentos usados durante as reações (LIMA e AGNES, 1999).

Porém, a aplicação eficaz de enzimas em sua forma livre apresenta algumas desvantagens, como alto custo de operação, dificuldade de recuperação do produto livre de enzima, impossibilidade de reutilização da enzima em novos processos e baixa estabilidade em condições não ideais. A dificuldade em se recuperar a enzima do meio reacional ao final da catálise, aliada à instabilidade e frequente inadequabilidade para uso em determinados solventes e/ou condições de pH, temperatura e exposição a agentes desnaturantes podem ser superadas por meio da técnicas de imobilização. Desta forma, estudos envolvendo imobilização enzimática com suportes sólidos têm sido amplamente estudadas (BORK, 2016).

A imobilização pode ser definida como o movimento independente das células ou enzimas na parte aquosa do sistema em uma superfície ou matriz que servirá de suporte (MILETIC et al, 2010). Este processo pode

ocorrer por meio de ligações químicas - ligação covalente, métodos físicos, como encapsulamento ou adsorção física (SHELDON; van PELT, 2013). A enzima imobilizada apresenta como vantagens uma maior estabilidade em relação à enzima livre e pode ser recuperada e reutilizada em novos ciclos reacionais (FERNANDEZ-LAFUENTE et al, 1998).

Os suportes utilizados para imobilização podem ser compostos de 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). É necessário observar as características da enzima ao ser imobilizada e o suporte precisa atender a alguns requisitos como afinidade pela enzima, capacidade de retenção da mesma, possibilidade de reutilização do mesmo suporte após ciclos de remoção da enzima, natureza atóxica e baixo custo de produção (BORK, 2016).

As lipases são enzimas pertencentes ao grupo das hidrolases, que atuam catalisando a conversão de triacilgliceróis a ácidos graxos livres e glicerol, atuando também em reações inversas. Apresentam um significativo potencial biotecnológico como catalisadores em reações de síntese orgânica em meio não aquoso utilizando processos simplificados com altos rendimentos (MESSIAS et al, 2011). Esta classe de enzimas apresenta um grande interesse comercial devido sua vasta aplicação industrial, incluindo desde a formulação de detergentes, degradação de óleos e gorduras, sínteses farmacêuticas e produção de cosméticos (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Entretanto, nem sempre as, NPMs, ao serem utilizadas como suportes, apresentam em sua estrutura as características necessárias para imobilizar enzimas em sua superfície, o que significa que esse suporte precisa sofrer uma modificação superficial para se tornar apto para imobilização, isto é, é necessário preparar essas partículas de modo a criar uma afinidade maior entre o núcleo magnético inorgânico e o catalisar orgânico a ser adsorvido, havendo uma troca de grupo funcional (BORK, 2016).

A lipase tem afinidade por grupos funcionais hidrofóbicos, visto que catalisam reações que têm como substratos óleos e gorduras, e, desta forma, as NPMs precisam sofrer uma modificação dos grupos químicos presentes inicialmente por um grupo químico com características hidrofóbicas.

Uma alternativa para promover esta modificação superficial, é o uso de surfactantes, como o lauril sulfato de sódio (SDS), que são foco de

estudos de vários autores como Lee et al (2009), Bork (2016) e Henriques et al (2018). Todos esses autores modificaram as nanopartículas de magnetita, trocando grupo químico oxalato pelo grupo químico lauril sulfato, este que, ao ser ligado a superfície da magnetita aumenta a característica hidrofóbica e permite que a parte apolar da enzima seja adsorvida fisicamente pela cauda apolar do suporte, aumentando os índices de imobilização (BORK, 2016).

Desta forma, este trabalho tem como objetivo a síntese de suportes de nanopartículas magnéticas a partir da co-precipitação de sais de ferro funcionalizadas com oxalato de amônio e posterior modificação superficial deste suporte com diferentes concentrações de lauril sulfato de sódio para analisar a influência da razão molar de NPM/SDS na imobilização. Os suportes serão caracterizados estruturalmente e posteriormente aplicados na imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus*



## 1.1 OBJETIVOS

### **Objetivo geral**

O objetivo deste trabalho é aprimorar uma metodologia de modificação superficial com lauril sulfato de sódio de um suporte de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com oxalato de amônio para imobilização de lipases. Este estudo envolve a síntese de suporte de NPM-SDS para determinar a influência da razão molar  $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{SDS}$  na imobilização e na atividade da enzima.

### **Objetivos específicos**

- a) Sintetizar nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) pelo método de coprecipitação de íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  funcionalizadas com oxalato de amônio;
- b) Modificar as nanopartículas magnetita-oxalato com lauril sulfato de sódio (SDS) com diferentes concentrações de SDS para obter suportes com características hidrofóbicas;
- c) Caracterizar os suportes funcionalizados com diferentes razões molares de magnetita/SDS em relação a sua curva de magnetização e a identificação dos grupos funcionais por espectroscopia de infravermelho.
- d) Imobilizar a lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em todos os suportes sintetizados, acompanhando a imobilização por meio da dosagem de proteína e determinação da atividade hidrolítica para derivado enzimático.



## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

De acordo com Faraji, Yamini e Rezaee (2010) a nanociência é um dos campos mais importantes na pesquisa e desenvolvimento da ciência moderna. A utilização de nanopartículas (NPs) de diferentes materiais oferece muitas vantagens devido a seu exclusivo tamanho e propriedades físicas. Devido à ampla aplicação de nanopartículas magnéticas (NPMs) em biomedicina, biotecnologia, engenharia, ciências dos materiais e áreas do meio ambiente, muita atenção tem sido dada a preparação de diferentes tipos de suportes magnéticos. A síntese de tamanhos uniformes de nanocristais é de fundamental importância, pois as propriedades das NPs dependem fortemente de suas dimensões.

As NPMs exibem grande área superficial e alta transferência de massa, qualidades muito apreciadas para um suporte catalítico (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2012). O suporte magnético ideal utilizado na biotecnologia deve possuir algumas propriedades específicas como o superparamagnetismo, forte capacidade de resposta magnética, alta estabilidade, reduzido tamanho de distribuição e pouca absorção de proteínas inespecíficas (HONG et al, 2008). Segundo Netto, Toma e Andrade (2012) as NPMs exibem sua melhor performance entre tamanhos de 10-20 nm, porém Fontanive et al (2014), que estudou o comportamento de NPMs em aplicações biomédicas, analisa que o tamanho das partículas depende muito da entidade biológica que elas irão interagir, por exemplo, partículas maiores são usadas como agente de contraste para ressonância magnética enquanto as menores (20nm) são úteis para carregar fármacos para tratar tumores.

Uma grande vantagem dessas partículas, além do controle de tamanho, é que são capazes de responder a um gradiente externo de campo magnético. Na maioria dos casos, as partículas superparamagnéticas (geralmente  $\text{Y-Fe}_2\text{O}_3$  e  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) não retém qualquer magnetização remanescente, após remoção do campo magnético, sendo assim de interesse para as aplicações in vivo (BERRY e CURTIS, 2003).

As NPM são facilmente obtidas a partir da co-precipitação química de  $\text{Fe}^{+2}$  e  $\text{Fe}^{+3}$  em solução alcalina, preferencialmente em amônia ou composto orgânicos de amônio (LEE et al, 2009).

Entretanto, devido à alta taxa de volume superficial e de magnetização, as NPMs são propensas a se agregar, o que irá limitar sua

aplicação. Assim, a modificação superficial da magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) se faz necessária (HONG et al, 2008).

### **2.1.1. Propriedades magnéticas e características das NPMs**

Os materiais magnéticos são classificados pela sua resposta ante uma aplicação externa de um campo magnético. Descrições de orientações de momentos magnéticos em um material ajudam a identificar diferentes formas de magnetismo observado na natureza (FARAJI; YAMINI, REZAEI, 2010). O comportamento magnético de diferentes materiais pode ser classificado como diamagnetismo, paramagnetismo, ferromagnetismo (SADIKU, 2012), além do superparamagnetismo, antiferromagnetismo e ferrimagnetismo (FONTANIVE et al, 2014).

Para Sadiku (2012), um material é dito diamagnético se tiver a magnetização remanescente  $\mu_r \leq 1$ , isto é, uma sensibilidade a um campo magnético externo muito pequena e negativa. O diamagnetismo ocorre em materiais em que os campos magnéticos se cancelam mutuamente, devido ao movimento de translação dos elétrons em torno do seu próprio eixo, sendo tais materiais fracamente afetados por um campo magnético. Já se o material tiver  $\mu_r \geq 1$ , é dito que o material é paramagnético. O paramagnetismo ocorre em materiais para os quais o campo magnético produzido pelos movimentos de translação dos elétrons em torno do núcleo e de rotação dos elétrons em torno do seu próprio eixo não se cancelam completamente, fazendo com que essa característica dependa da temperatura. Os materiais ferromagnéticos têm  $\mu_r \gg 1$ , isto é, a sensibilidade ao campo magnético é muito grande e positivo, sendo características desses materiais a capacidade de serem magnetizados fortemente através da aplicação de um campo de força e a retenção de parte desta magnetização após a remoção do mesmo. Estes materiais podem tornar-se paramagnéticos lineares quando há aumento de temperatura, ou seja, se um ímã for aquecido acima de sua temperatura de Curie ( $770^\circ\text{C}$  para o ferro, por exemplo), o material perde sua magnetização por completo.

Logo, os materiais diamagnéticos não possuem um momento spin, mas possuem um momento orbital, sendo este comportamento justificado pelo fato dos elétrons apresentarem tendência a se agruparem em pares com spins orientados em direções opostas, fazendo com que o campo de indução magnética seja o oposto ao campo externo, resultando

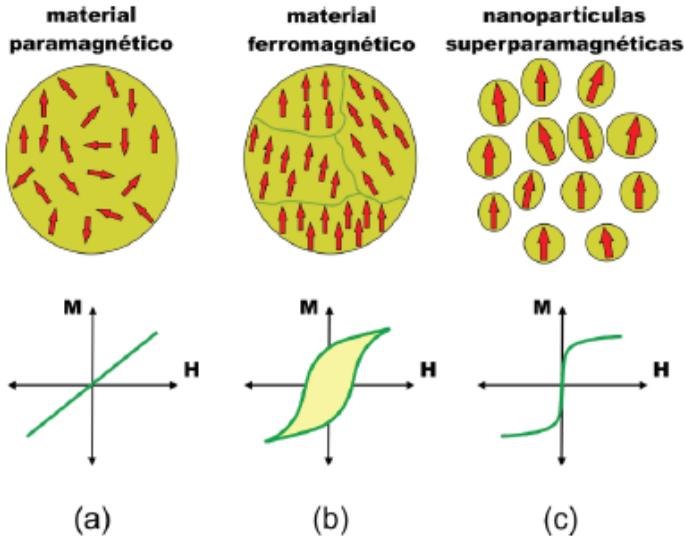
em uma repulsão deste campo externo, isto é, sempre respondem com uma tendência de se afastarem da região em que este campo é mais forte, e por este motivo diz-se que possui magnetismo negativo. Já os materiais paramagnéticos possuem elétrons desemparelhados e ordenados aleatoriamente, alinhando-se quando expostos a um campo magnético externo, produzindo assim seu próprio campo magnético. Os ferromagnéticos têm seus elétrons desemparelhados e geralmente apresentam magnetização diferente de zero, reagem fortemente ao um campo magnético externo e um estado de magnetização uniforme, porém quando expostos a um campo magnético, tendem a se alinhar conforme este campo, e após a retirada do campo, se observa uma magnetização remanescente (FONTAINE et al, 2014; SILVA, 2008, SADIKU, 2012; FARIA; LIMA, 2005).

O comportamento magnético é definido ao analisar sua curva de histerese. Ao aplicar um campo magnético  $M$  em um material inicialmente desmagnetizado, este seguirá até um valor máximo que é conhecido como magnetização de saturação ( $M_s$ ). Ao inverter o sentido do campo magnético, ocorre o decrescimento da magnetização, levando a um valor chamado de magnetização remanente ( $M_r$ ), que nada mais é do que uma magnetização residual que permanece no material. Ao inverter novamente o campo  $M$  aplicado, o  $M_r$  atinge valores menores que  $M$ , até chegar a um valor em que o campo magnético aplicado é nulo, o que é conhecido como campo coercitivo ( $H_c$ ) (AUGUSTUS; RIBEIRO, 2000; HENRIQUES, 2016).

O termo “superparamagnetismo” não é muito preciso, porém é normalmente utilizado para enfatizar o comportamento magnético de partículas paramagnéticas, resultante só acoplamento de vários milhares de átomos, em comparação com o paramagnetismo de um único átomo. Outra característica é que as partículas superparamagnéticas apresentam um sistema operacional de magnetização as um campo magnético externo sem histerese (THUNEMANN et al, 2006; BORK, 2016).

A Figura 5 representa curvas de histerese de diferentes comportamentos magnéticos.

Figura 1 - Orientações de momentos magnéticos e suas respectivas curvas de histerese magnética esperada para diferentes comportamentos magnéticos como: de (a) materiais paramagnéticos, (b) materiais ferromagnéticos e (c) materiais superparamagnéticos.



Fonte: FONTANIVE, 2014

O tamanho e a forma das NPs dependem do processo de obtenção da nanoestrutura. Os métodos de síntese influenciam na forma da partícula podendo ser esférica, retangular, etc, o que interfere na área e no diâmetro (GUPTA, GUPTA, 2016; FONTANIVE *et al.*, 2014). Desta forma, as características das partículas podem sofrer alterações dependendo do método de síntese escolhido. Os principais métodos de caracterização de NPMs são: espectrometria de correlação de fótons (espalhamento de luz dinâmico), difração de raios-X (DRX), espalhamento de luz estático, microscopia eletrônica de transmissão (MET), microscopia de força atômica, entre outros (FONTANIVE *et al.*, 2014).

## 2.1.2. Síntese de nanopartículas magnéticas

Há vários métodos químicos que podem ser utilizados para sintetizar nanopartículas: coprecipitação, microemulsão, decomposição térmica, sonoquímico, decomposição química e hidrotérmico. A síntese de nanopartículas magnéticas é um processo complexo devido a sua natureza helicoidal. O primeiro grande desafio consiste em definir as condições experimentais. O segundo ponto é selecionar um processo reprodutivo que pode ser industrializado sem processos complexos de purificação como ultracentrifugação, filtração magnética ou gradiente de campo fluído (LAURENT et al, 2008).

Existem vários métodos conhecidos descrevendo a síntese de nanopartículas. Dentre as metodologias mais empregadas, Martinez (2013) destaca:

(i) co-precipitação: utilizada geralmente para obtenção de óxidos e consiste na co-precipitação homogênea ou heterogênea de soluções de sais dos metais de interesse pela adição de uma base na presença de atmosfera inerte. O tamanho, a forma e a composição das nanopartículas dependem da natureza, temperatura de reação e força iônica do meio.

(ii) microemulsão: consiste na dispersão estável de dois líquidos imiscíveis, os quais são estabilizados por um terceiro componente, um surfactante ou mistura de um surfactante/co-surfactante. Pode ser utilizada para obtenção de óxidos ou partículas metálicas através da escolha do agente precipitante, respectivamente, ácidos ou bases e agente redutor. Embora leve a um bom controle de tamanho de partícula, apresenta dificuldades na purificação/lavagem das partículas e, no caso de metais, geralmente os processos de lavagem levam a oxidação e a síntese de pouca quantidade de partículas cada vez.

(iii) síntese hidrotermal ou solvotérmica: sintetiza NPM e pós ultrafinos. As reações são realizadas em meio aquoso em reatores ou autoclaves em que a pressão pode chegar a 2000 psi e a temperatura a 200°C. O objetivo desta técnica é alcançar uma melhor dissolução com elevada difusão das espécies reativas. Essa metodologia leva a bom controle de tamanho e polidispersividade, entretanto necessita de reatores e fornos específicos o que encarecem o processo (LAURENT et al, 2008; MARTINEZ, 2013; HENRIQUES, 2016).

Ainda segundo Laurent et al (2008) a síntese de nanopartículas magnéticas pelo método de co-precipitação é provavelmente o mais simples e o mais eficiente. Os autores apresentam uma extensa revisão a respeito de vários métodos como o método de síntese hidrotérmico,

método sol-gel – que é baseado na hidroxilação e condensação de precursores moleculares em solução originando uma solução de nanopartículas, decomposição térmica e microemulsão.

Henriques et al (2018) e Bork (2016) sintetizaram NPMs pelo método de co-precipitação dos íons de  $Fe^{+2}$  e  $Fe^{+3}$  funcionalizados com oxalato de amônio e posteriormente modificadas com SDS para conferir a essas NPMs caráter hidrofóbico para imobilização de lipase. Henriques (2018), ao analisar o tamanho dessas partículas encontrou um diâmetro médio de  $5,5 \pm 0,3$  nm através de análises de microscopia de transmissão eletrônica e difração de Raios-x.

## 2.2. ENZIMAS

Enzimas são catalisadores biológicos muito utilizados em processos biotecnológicos. Esses biocatalisadores elevam consideravelmente a velocidade das reações, requerem condições brandas, são compatíveis com os substratos sintéticos, apresentam especificidade de substrato muito ampla e, em alguns casos, catalisam reações de síntese e degradação e podem apresentar seletividade quanto ao tipo de reação (WARNER; CANNON; DYE, 2004; MESSIAS et al, 2011).

O uso industrial de enzimas tem possibilitado o desenvolvimento de processos tecnológicos sem causar riscos ambientais. De acordo com Messias et al (2011) mais de 400 enzimas são conhecidas e aproximadamente 200 são utilizadas comercialmente, sendo a maioria de origem microbiana. Das enzimas industrializadas, ao menos 75% são hidrolases e destas, 90% são produzidas por microrganismos através de processos fermentativos. As lipases constituem o terceiro maior grupo de enzimas comercializadas, ficam atrás apenas das proteases e das carboidrases.

### 2.2.1. Lipases

As lipases (E.C 3.1.1.3) constituem um versátil grupo de enzimas que podem hidrolisar os ésteres de ácidos graxos. Essas enzimas possuem triglicerídeos como substratos naturais. Segundo Kumar (2016, apud Rios, 2018, p.3) as lipases estão entre as enzimas mais amplamente utilizadas em tecnologia enzimática, devido a sua ampla especificidade para alguns substratos e sendo capazes de catalisar diferentes reações,

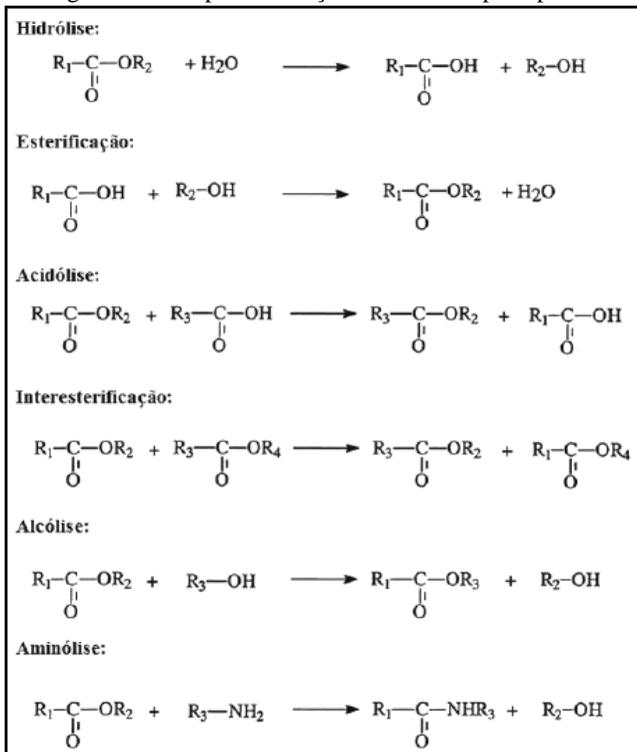
como hidrólise ou síntese de ésteres, esterificação, transesterificação, entre outras. Devido ao papel fundamental no metabolismo de gorduras, lipases são largamente utilizadas na natureza e em aplicações industriais. Elas também são capazes de hidrolisar/sintetizar uma grande variedade de ésteres de ácidos carboxílicos. (FERNANDEZ-LAFUENTE et al 1998; BUKHARI et al, 2014).

As principais fontes de obtenção de lipases para aplicação industrial têm sido os micro-organismos, embora também possam ser produzidas por plantas e animais. Tanto micro-organismos eucariotos (leveduras e fungos) como procariotos (bactérias) são produtores de lipases e suas propriedades variam de acordo com a sua procedência (SHAMRA; CHISTI, BANERJEE, 2001).

Os substratos naturais para lipase são óleos e gorduras contendo triacilgliceróis constituídos de ácidos graxos de cadeia longa, ou seja, ligações ésteres tríplexes. (BIER, 1955; MESSIAS et al, 2011). Se as condições forem favoráveis, as lipases também conseguem catalisar reações de síntese, como de esterificação, transesterificação e aminólise, sendo que a atividade de água no meio reacional é um dos fatores determinantes para o equilíbrio da reação no sentido direto (hidrólise) ou inverso (esterificação) (HENRIQUES et al, 2018; MESSIAS et al, 2011; MAHADIK et al, 2002). A Figura 1 mostra algumas reações catalisadas pela lipase.

A primeira vez que uma lipase por isolada foi por Claude Bernard em 1856, que a isolou do suco pancreático do porco e verificou que esta enzima solubilizava gotas de óleo. Entretanto, anos mais tarde foi possível verificar que lipases de origem bacteriana eram mais estáveis e mais fáceis de serem obtidas, quando comparadas as de origem animal (MESSIAS *et al*, 2011). De maneira geral, as lipases não requerem cofatores. Atuam em ampla faixa de pH, são estáveis a altas temperaturas, possuem elevada especificidade e propriedades régio, quimio e enantioselectividade que fazem com que sejam altamente aplicáveis em processos industriais (VILLENEUVE et al, 2009; MESSIAS et al, 2011).

Figura 2- Exemplos de reações catalisadas por lipases



Fonte: Adaptada de VILLENEUVE *et al*, 2009.

As lipases são amplamente utilizadas no processamento de gorduras e óleos, formulações de detergentes e desengordurantes, processamento de alimentos, síntese de químicos finos e farmacêuticos, biodiesel, manufatura de papéis, produção de cosméticos, etc. Uma das maiores aplicações industriais da lipase tem sido como aditivo em detergentes, pois facilitam os processos de limpeza, hidrolisando lipídios e favorecendo a solubilização destas biomoléculas em água. (PANDEY, 2003). Essas lipases são adicionadas em detergentes líquidos e sólidos, domésticos e industriais, e devem ser estáveis em pH alcalino, em altas temperaturas e não devem sofrer desnaturação pela ação dos surfactantes. A principal vantagem de lipases nos detergentes em substituição aos polissulfatos está na biodegradabilidade e redução dos

impactos ambientais, incluindo-se a vida aquática (HASAN; SHAD; HAMEED, 2006). A Tabela 1 indica algumas aplicações industriais de lipases microbianas (SHARMA; CHISTI; BANERJEE, 2001).

Tabela 1 – Aplicações industriais de lipases microbianas

<b>Indústria</b>	<b>Ação</b>	<b>Produto ou aplicação</b>
Detergentes	Hidrólise de gorduras	Remover manchas de tecidos
Alimentos lácteos	Hidrólise de gordura do leite, maturação do queijo, modificação da manteiga	Desenvolvimento de agentes flavorizantes no leite, queijo e manteiga
Panificação	Melhoria de aromas	Prolongamento da vida útil
Bebidas	Melhoria de aromas	Bebidas
Molhos	Melhoria da qualidade	Maioneses, molhos e cremes de leite
Alimentos saudáveis	Transesterificação	Alimentos saudáveis
Carnes e peixes	Melhoria de aroma/sabor	Remoção de gorduras
Gorduras e óleos	Transesterificação, hidrólises	Manteiga de cacau, margarina, ácidos graxos, glicerol, mono e diglicerídeos.
Farmacêutica	Transesterificação, hidrólises	Lipídios especiais, auxílios digestivos
Cosmética	Sínteses	Emulsificantes, hidratantes
Couro	Hidrólises	Produtos à base de couro
Papel e celulose	Hidrólises	Papel com melhoria na qualidade
Limpeza	Hidrólises	Remoção de gorduras

Fonte: adaptado de SHARMA; CHISTI; BENERJEE, 2001.

Devido ao seu 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 (BORK, 2016).

É conhecido que as lipases possuem um mecanismo complexo de catálise. O sítio ativo das lipases é geralmente caracterizado pela composição do trio serina, histidina e aspartato, complexos acil-enzimas,

sendo os intermediários cruciais em todas as reações catalíticas da lipase (REETZ, 2002).

As lipases apresentam uma característica bastante peculiar: na presença de interfaces hidrofóbicas elas sofrem uma mudança conformacional, isto é, elas têm seu sítio ativo “aberto”, ocorrendo uma funcionalização da enzima. Deste modo, as lipases parecem se adsorver fortemente em interfaces hidrofóbicas através de uma grande superfície hidrofóbica que circunda o sítio catalítico (FERNANDEZ-LAFUENTE et al, 1998).

A ativação interfacial da lipase ocorre na interface líquido-óleo, um fenômeno que pode ser marcado como uma característica estrutural única desta classe de enzimas. As lipases contêm uma unidade oligopeptídica helicoidal que blinda o centro ativo. Em soluções aquosas homogêneas, lipases estão em equilíbrio em duas formas. Uma forma principal fechada e inativa, onde uma tampa (*lid*) ou aba isola o centro ativo do meio e uma forma aberta e ativa, em que a aba é movida para permitir a acessibilidade do substrato ao centro ativo, conforme mostra a Figura 2. Em interações com interfaces hidrofóbicas como gotículas, as lipases estão sujeitas a movimentos de tal maneira que expõem o sítio ativo, fornecendo livre acesso ao substrato (ativação interfacial). (PALOMO et al, 2002; REETZ, 2002).

Figura 3 - Mecanismo de catálise da lipase



Fonte: adaptado de PALOMO *et al*, 2002.

As lipases mais estudadas e mais citadas em pesquisas costumam ser a lipase de *Rhizomucor miehei* (RM), a *Candida antarctica* B e a *Thermomyces lanuginosus*.

A lipase de *Candida antarctica* B (CAL B) atrai muita atenção devido a sua alta estabilidade, estereosseletividade e enantioseletividade, o que a torna superior a outras lipases em bioprocessos (JUN et al, 2013).

Esta lipase é uma das mais aplicadas e estudadas enzimas imobilizadas na produção de ésteres de glicerol e biodiesel (BORK, 2016).

Já a lipase de *Rhizomucor miehei* (RM) é uma enzima comercial disponível tanto na forma solúvel quanto imobilizada, e apresenta uma atividade muito alta e boa estabilidade em diversas condições experimentais. Uma das características desta enzima é sua especificidade para triglicerídeos que contém ácidos graxos de baixo peso molecular (RODRIGUES e FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

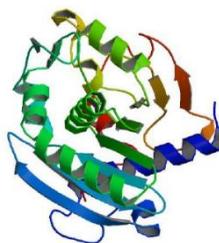
### 2.2.2 Lipase de *Thermomyces lanuginosus*

A lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL), já foi chamada anteriormente de *Humicola lanuginosa*. É a enzima responsável pela ativação lipolítica da Lipolase® (enzima livre) produzida pela Novozymes ou na forma imobilizada como Lipozyme TL IM® (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A TLL é uma lipase bastante estável, mantém sua atividade a uma média de temperatura entre 50 – 60°C, com o máximo de atividade em pH próximo a 9. As lipases, em geral, tendem a formar agregados biomoleculares, confrontando seus sítios ativos abertos. TLL é uma das lipases com maior tendência a formar esses agregados biomoleculares, tão fortemente que mesmo outras lipases imobilizadas podem ser usadas para purificar ou mesmo imobilizar a TLL. (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Embora seja uma enzima bastante estável, qualquer melhoria adicional em sua estabilidade como processos de imobilização, pode ser interessante para ampliar ainda mais a sua gama de aplicações (CIPOLATTI *et al* 2015). Brzozowski *et al* (2000) desenvolveu por cristalografia um esquema estrutural da TLL, mostrada na Figura 3.

Figura 4 - Esquema da estrutura da TLL



Fonte: Adaptado de BRZOZOWSKI *et al*, 2000.

### 2.3. IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

Como definição, imobilizar é fixar algo, impedindo-o de se mover. No caso de tecnologia enzimática, esse termo se refere ao confinamento físico ou localizado em certa região do espaço com a retenção de suas atividades catalíticas (MILETIC et al, 2010). Na imobilização enzimática, alguma mudança estrutural pode ocorrer, alterando assim suas propriedades e atividades, em partes.

De acordo com Mateo et al (2007), o uso da imobilização enzimática facilita consideravelmente o design do reator e o controle da reação, desde que a simples remoção das enzimas seja uma forma eficaz de parar a reação. Além disso, a capacidade de reutilização é uma grande vantagem da enzima imobilizada, o que impacta diretamente o custo do processo produtivo (LI et al, 2011). A imobilização é um processo em que a enzima é atraída para um suporte antes de ser usada em uma reação (SWANALATHA, ESTHER e DHAMODHARAN, 2013).

As enzimas tendem à inativação ao longo do tempo, diferentemente de catalisadores convencionais, por isso é recomendada a imobilização destas em suportes suficientemente inertes e que não sejam afetados pelo processo (BORK, 2016).

Miletic et al (2010) e Sheldon e van Pelt (2013) exemplificam dois tipos de imobilização: reversível e irreversível. A imobilização irreversível previne a enzima de lixiviação enquanto a reação acontece, mas, uma vez que a atividade enzimática diminuiu, o suporte precisa ser eliminado junto com a enzima. Porém, a imobilização reversível permite a recuperação do suporte, antes da inativação da enzima.

Há vários métodos utilizados para imobilização de enzimas, a seguir seguem os mais citados:

(i) Adsorção física: é o método mais simples e envolve interações reversíveis de superfície entre enzimas e o suporte. Como principais vantagens se destacam ser um processo barato, rápido e simples, pois não alterações químicas nem para o suporte e nem para a enzima e a facilidade na remoção da enzima do suporte para regeneração do catalisador, isto é, quando a enzima imobilizada fica inativa, esta poderá ser removida do suporte para dar lugar a uma enzima ativa (BLACH e CLARK, 1997). Como desvantagens são as dessorção da enzima do suporte com os reusos e a ligação não específica (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

(ii) 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. Para conseguir uma ligação eficiente, a funcionalidade do suporte e/ou enzima deve ser ativada antes da imobilização por meio de tratamentos com reagentes específicos, os quais deixarão os grupos químicos a serem ligados com maior reatividade (CAO, 2005). A vantagem deste método é a resistência da ligação – é uma imobilização irreversível- e a estabilidade de imobilização (não ocorre lixiviação) e as desvantagens são os altos custos e baixos rendimentos, tal como a conformação da enzima e, por consequência a atividade será fortemente influenciada pela ligação covalente (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

(iii) Ligações cruzadas (*cross-linking*): é um tipo de imobilização livre de suporte e envolve as enzimas juntando-se umas as outras para formar uma estrutura tridimensional. A ligação é formada por meio de reagente bi ou multifuncionais, como o glutaraldeído. Esta abordagem oferece claras vantagens: alta concentração de atividade enzimática no catalisador, alta estabilidade e baixos custos de produção devido à exclusão de um suporte adicional (SHELDON e VAN PELT, 2013). Como desvantagens este método apresenta baixos rendimentos de imobilização e ausência de propriedades mecânicas (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

(iv) Encapsulamento ou aprisionamento em matriz sol-gel: é um método em que a enzima é livre em solução, porém restrita ao movimento por uma estrutura reticular de um gel. É utilizada principalmente para imobilização de células, e tem a desvantagem inevitável de que o suporte vai agir como uma barreira à transferência de massa (MURTY, BHAT e MUNISWARAN, 2002).

A Figura 4 exemplifica os diferentes métodos de imobilização enzimática (2013).

Figura 5– Alguns métodos de imobilização enzimática



Fonte: adaptado de SHELDON e van PELT, 2013.

### 2.3.1 Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização enzimática

As nanopartículas magnéticas tem adquirido grande importância no campo da bioquímica, principalmente na imobilização de diversos tipos de enzimas, pois elas podem ser facilmente separadas da reação mediante a aplicação de um campo magnético externo e por exibirem baixa toxicidade e alta biocompatibilidade (BUCAK; ALTAN, 2017). Quando o meio reacional é formado por óleos e gorduras, há certa dificuldade em separar o biocatalisador através de métodos convencionais, sendo por isso, o suporte com características magnéticas uma grande vantagem. Além disso, para utilizar partículas magnéticas em aplicações biotecnológicas, não basta apenas o magnetismo, essas partículas também precisam apresentar ligantes na superfície que permitam a união da partícula com a enzima (BORK, 2016).

Fernandes et al (2017) estudou a preparação e caracterização de NPMs revestidas de sílica e funcionalizadas com (trimetoxisililpropil) etilenodiamina ácido triacético – EDTA-TMS e íons de cobre quelato para imobilização da lacase, enzima do tipo oxidase. No seu estudo, o suporte preparado demonstrou ser eficiente, tendo como vantagem uma separação do meio reacional facilmente promovida e permitindo a reutilização da biocatálise. O suporte demonstrou boa reusabilidade (perda de 73% da atividade inicial após cinco reusos) e boa estabilidade operacional. Quanto à degradação do corante sintético Indigo Carmine (IC), a lacase imobilizada mostrou melhor resultado – após 4h de reação, removeu 28% do corante, enquanto a enzima livre removeu 21%. A autora cita que o único inconveniente é a mudança do pH ótimo da enzima livre (4,5) e imobilizada (3,5), o que pode ter um efeito negativo na taxa de conversão do substrato.

Já Xiao et al (2016) imobilizou aril-sulfatase em nanopartículas magnéticas com o objetivo de remover o sulfato presente no ágar e assim obter agarose (muito utilizada em eletroforese e como resina cromatográfica). Ele comparou a enzima livre e a enzima imobilizada no suporte de NPM em relação ao efeito de pH e temperatura. Quanto ao pH, a enzima imobilizada demonstrou ampla faixa de pH, em comparação com a enzima livre, o que melhora a tolerância enzimática. Já, em relação à temperatura, a temperatura ótima (50°C) da enzima livre não muda após imobilização, entretanto, as análises demonstraram que a atividade enzimática da enzima livre diminuiu consideravelmente quando

comparada a enzima imobilizada com o aumento de temperatura. A aril-sulfatase imobilizada manteve 65% da atividade a 65°C, enquanto a enzima livre manteve apenas 42% na mesma temperatura. O autor considera que a imobilização de aril-sulfatase no suporte limitou a mobilidade conformacional das enzimas a alta temperatura, impedindo-a da inativação, sendo a enzima livre vulnerável a desnaturação. Além disso, após 7 ciclos, a enzima imobilizada conservou 61,7% da capacidade de dissulfonação inicial, mantendo uma taxa de 46% de remoção de sulfato após 90 minutos de tratamento enzimático. O autor considera o suporte promissor para aplicação industrial, incluindo a conversão enzimática de ágar para agarose.

Bork (2016) sintetizou nanopartículas magnéticas funcionalizadas com oxalato com posterior modificação superficial com SDS para imobilizar lipases de *Rhizomucor miehei* e de *Candida antarctica* B e estudou o efeito da aplicação de ultrassom e da frequência de agitação mecânica na síntese desse suporte. Ele observou que o uso de ultrassom provoca alterações positivas nas partículas, favorecendo a imobilização de lipases. Nos seus estudos, Bork demonstrou que mesmo após 16 ciclos consecutivos de atividades hidrolíticas, a perda de atividades da lipase foi pequena, verificando que as lipases estavam fortemente adsorvidas no suporte.

Henriques (2016) imobilizou a TLL em NPMs por meio de mecanismo de adsorção e coimobilizou com sucesso a  $\beta$ Gal e a QM na TLL já imobilizada através da modificação química da TLL por agentes de reticulação como glutaraldeído e dextrano-aldeído.

Há também ampla faixa de estudos utilizando NPMs no transporte de fármacos. Segundo Ober, Gupta (2011), a tecnologia de nanopartículas tem a capacidade de melhorar a eficiência dos medicamentos, reduzir ao mínimo os efeitos secundários e proporcionar uma entrega específica.

Karimi (2016) estudou a imobilização de lipase em nanopartículas magnéticas de óxido de ferro mesoporosas para síntese enzimática de biodiesel. O autor utilizou ortossilicato de tetraetileno como precursor e brometo de hexadeciltrimetilamônio como dispersante para formação dos poros e também como solução tampão. O resultado foi uma partícula de tamanho 20 nm e uma pequena perda de atividade, pois mesmo após cinco ciclos a eficiência da reação estava em torno de 54%, o que levou o autor a concluir que a imobilização nesse suporte foi bem sucedida.

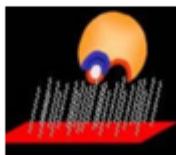
### 2.3.1 Modificações superficiais de nanopartículas magnéticas para imobilização de lipases

O contato direto das enzimas com a superfície da magnetita pode impedir a flexibilidade estrutural da enzima. A ligação da superfície da NPM é presumida para atuar como um espaçador entre a NPM e a enzima imobilizada, assim atenua o problema de flexibilidade. (LEE et al, 2008).

Na ausência de interfaces, as lipases possuem alguns elementos estruturais secundários (chamados de “tampa”) revestindo seu sítio ativo e tornando-os inacessível ao substrato, como já comentado anteriormente. Porém, na presença de interfaces hidrofóbicas, importantes mudanças estruturais ocorrem, produzindo a abertura dessas “tampas” das lipases. Essas mudanças resultam na exposição da face hidrofóbica da lipase, essa, se inteirando com a interface hidrofóbica do suporte, conferindo uma ativação interfacial e funcionalidade da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE et al, 2010; PALOMO et al, 2002)

Essa ativação interfacial pode ser promovida por diferentes estruturas hidrofóbicas, como substratos insolúveis ou suportes hidrofóbicos, conforme Figura 6 (PALOMO et al, 2002). A complexidade desse mecanismo de ação causa algumas dificuldades em compreender e controlar o comportamento de lipases em sínteses orgânicas tanto em escala de laboratório como industrial. Entretanto, conhecendo esse mecanismo de ação, é possível desenvolver novas fontes e técnicas de imobilização (FERNANDEZ-LAFUENTE, 1998).

Figura 6 - Ativação interfacial da lipase em estruturas hidrofóbicas.



Suporte hidrofóbico



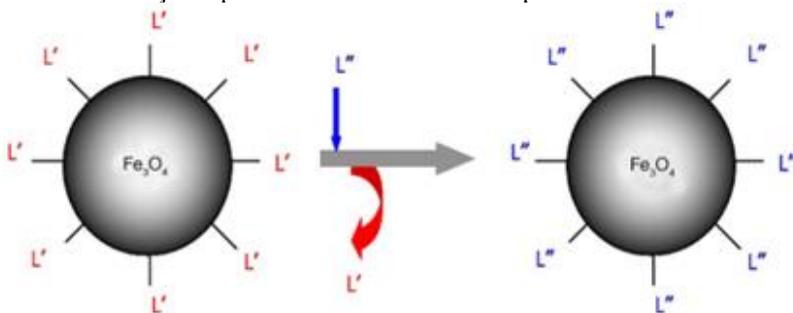
Gota de óleo

Fonte: adaptado de PALOMO et al, 2002

### 2.3.2. Modificação superficial de NPM com SDS

As NPMs podem ser modificadas superficialmente a fim de obter um suporte com maior homogeneidade e compatibilidade, dependendo da função a que se destina essa enzima (TIE et al, 2006). Para tornar a NPM hidrofóbica é necessário que ocorra uma modificação superficial da nanopartícula, isto é, que ocorra a troca do grupo funcional aderido a NPM, antes hidrofílico ( $L'$ ) para um com características hidrofóbicas ( $L''$ ), conforme indica a Figura 7.

Figura 7 – Modificação superficial da NPM em duas etapas.



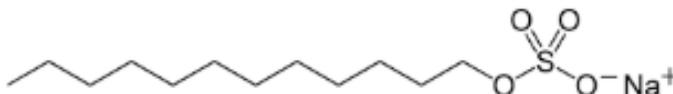
Fonte: Tie et al, 2006.

Lee et al (2009), ao sintetizar NPM com oxalato de amônio ( $L'$ ), reporta que a lipase teve uma superativação ao ser imobilizada em um suporte hidrofóbico, sendo utilizado neste caso o SDS ( $L''$ ), um tensoativo aniônico, para modificação superficial da nanopartícula magnética. Ele observou que ao utilizar a superfície hidrofóbica na imobilização houve melhoras significativas na atividade específica da lipase tanto na mudança de pH quanto de temperatura. No caso pH, a faixa ótima foi aumentada de 6,7 (enzima livre) para 7,7 (enzima imobilizada), tornando a lipase mais estável em condições alcalinas. Já para a variação de temperatura, tanto a enzima livre quanto a imobilizada apresentaram atividade específica máxima na faixa de 37 e 40°C, entretanto a enzima imobilizada teve uma melhora significativa na estabilidade térmica, aumentando em quase 1,5 vezes a atividade específica quando comparada com a enzima livre.

Um surfactante – também chamado de tensoativo - é aquele capaz de modificar as propriedades da superfície de um líquido, ou seja, os surfactantes atuam reduzindo a tensão superficial do líquido,

permitindo a sua interação com outras substâncias. São moléculas anfifílicas por possuírem ambas as regiões estruturais, hidrofílica e hidrofóbica, que dinamicamente se associam espontaneamente em solução aquosa a partir de uma determinada concentração denominada concentração micelar crítica (CMC). Acima dessa concentração as moléculas do tensoativo formam grandes agregados moleculares de dimensões coloidais. A esses agregados, que geralmente contem 60 a 100 moléculas do tensoativo, dá-se o nome de micelas. A CMC depende da estrutura do tensoativo (tamanho da cadeia do hidrocarboneto) e das condições do meio (concentração iônica, contra-íons, temperatura, etc) (MORAES; REZENDE, 2004). O lauril sulfato de sódio ou dodecil sulfato de sódio (SDS) é um tensoativo aniônico de fórmula  $C_{12}H_{25}SO_4Na$  e fórmula estrutural conforme a Figura 8.

Figura 8 – Fórmula estrutural do lauril sulfato de sódio



Fonte: Química Alkano.

Em relação ao SDS, Henriques (2016) afirma:

“O SDS é um surfactante aniônico que possui uma extremidade polar formada por um grupo sulfato e outra extremidade praticamente apolar formada por um grupo alquila linear de doze carbonos. A aplicação deste composto na funcionalização do suporte tem como função atuar como um “espaçador” entre a superfície da partícula e da lipase, além de atenuar possíveis mudanças conformacionais causadas pela ligação direta entre o suporte e a enzima. Espera-se que a enzima, desta forma, se ligue através de suas zonas hidrofóbicas à cadeia carbônica também hidrofóbica do SDS através da ativação interfacial.”

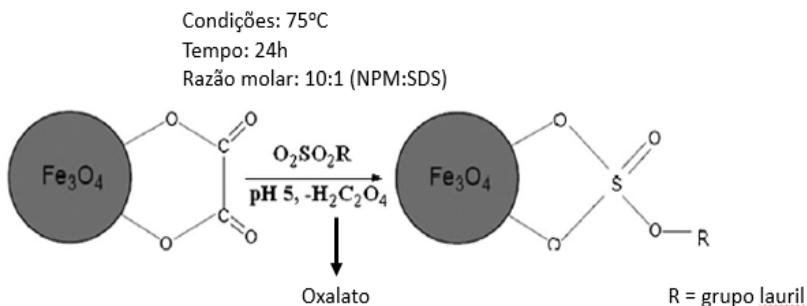
Moraes e Rezende (2004) determinaram a CMC do SDS por condutividade e obteve o valor de 8,1 mmol/L.

Na metodologia de Lee et al (2009), as NPMs foram sintetizadas utilizando primeiramente oxalato de amônio. Após essa síntese, a segunda etapa constituía em trocar o grupo oxalato pelo grupo lauril, o que fornece uma característica hidrofóbica ao suporte, conforme Figura 9. Essa funcionalização foi feita utilizando uma razão molar 10:1 (oxalato-NPM:SDS) e em ambiente ácido (pH 5) e a 75°C, mas não foi mencionado o tempo de reação e nem a razão da escolha do autor por essa razão molar.

Bork (2016) sintetizou nanopartículas magnéticas modificadas com lauril sulfato de sódio em uma razão molar NPM/SDS de 2:1, e comparou o efeito da aplicação do uso do ultrassom na modificação superficial. Em seus experimentos o autor imobilizou as lipases de *Rhizomucor miehei* (RM), de *Candida antarctica* B e avaliou os reusos, a estabilidade térmica destas lipases no suporte sintetizado.

Henriques et al (2018), seguiu a metodologia de Lee et al (2009) e de Bork (2016) para a síntese de NPM-SDS e considerou o tempo de reação para funcionalização de 24h sob agitação e razão molar (NPM:SDS) 1:2. Os resultados obtidos por Henriques demonstram a necessidade de um estudo mais aprofundado sobre a razão molar ideal de NPM:SDS e uma otimização no tempo de reação, visto que o tempo de 24h é muito longo e não há nenhuma referência sobre a razão de se ter estipulado esse tempo.

Figura 9– Modificação superficial de de NPM-SDS em duas etapas conforme Lee et al (2009).



Fonte: Henriques (2016)



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAIS

Para a síntese do suporte NPM-SDS foram utilizados sulfato de ferro (III) monoidratado, sulfato de ferro (II) heptaidratado, oxalato de amônio monoidratado, hidróxido de amônio 32 % (v/v) e lauril sulfato de sódio (SDS). Todos os reagentes são da Vetec.

Para imobilização da lipase no suporte de NPM-SDS foi utilizada a lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) da Novozymes (Araucária-BR). Para a determinação do teor de proteínas foi utilizado o ensaio de Bradford, utilizando o reagente azul brilhante de *Coomassie*. Para a determinação da atividade hidrolítica das enzimas foi utilizado o substrato sintético butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) (Sigma-Aldrich).

#### 3.2. MÉTODOS

##### 3.2.1 Síntese de NPM-OX

As nanopartículas magnéticas foram sintetizadas de acordo com a metodologia de Bork (2016) e Henriques et al (2018), em duas etapas. Primeiro 11,12 g de sulfato ferroso e 5,68 g de oxalato de amônio foram adicionados a 100 mL de água, sendo desoxigenado com N<sub>2</sub> até formar uma mistura amarela homogênea. Após essa mistura inicial, foi adicionado 16 g de sulfato férrico e a solução foi aquecida até 75 °C e mantida sob agitação mecânica de aproximadamente 1100 rpm até completa dissolução. Após atingir a temperatura, o pH foi corrigido para 9 com a adição de hidróxido de amônio (aproximadamente 50 mL), sendo formada uma solução escura, e a suspensão foi mantida sob agitação por 1 h. Após o término da reação, a suspensão foi lavada várias vezes com água destilada, com o auxílio de um imã, até completa eliminação do excesso de hidróxido de amônio. Em seguida a amostra foi congelada para posterior liofilização. Cada reação sintetizou o equivalente a 6 g de magnetita funcionalizada com oxalato de amônio (NPM-OX).

##### 3.2.2. Síntese NPM-SDS

Para a modificação superficial das NPMs com SDS, foram testados cinco suportes com quantidades diferentes de lauril sulfato de

sódio, variando-se a razão molar entre a magnetita - que apresenta uma massa molar de 282 g/mol) e o SDS – de massa molar 288,5 g/mol, 1:1, 5:1, 10:1, 15:1 e 20:1. Foram sempre utilizadas em cada reação 3 g de suporte (NPM-OX) em 80 mL de água, variando a quantidade de SDS entre 0,1865 e 3,7000 g (Tabela 2). O tempo de reação foi de 6 h e a temperatura foi mantida a 75°C. Foi feita a desoxigenação da suspensão com N<sub>2</sub> e adicionado HCl para baixar o pH da solução para 5. Após a reação, a solução foi lavada com água destilada para retirada do SDS em excesso, a amostra foi congelada para posterior liofilização.

Tabela 2 – Massas de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com oxalato (NPM-OX) e lauril sulfato de sódio (SDS) utilizadas para a síntese dos suportes estudados em 80 mL de água.

<b>Suporte</b>	<b>NPM-OX (g)</b>	<b>SDS (g)</b>	<b>Razão molar (magnetita:SDS)</b>
1	3	3,7000	1:1
2	3	0,7400	5:1
3	3	0,3700	10:1
4	3	0,2450	15:1
5	3	0,1865	20:1

As razões molares foram estabelecidas tendo como base o estudo feito por Lee et al (2009), que utilizou a razão molar 10:1 em seus experimentos. De forma a obter resultados eficientes sobre a influência da quantidade de SDS no suporte de NPM-OX, o primeiro suporte sintetizado foi baseado na concentração micelar crítica do SDS, que é a que se apresenta na razão molar 20:1, de acordo Moraes e Rezende (2004).

### 3.2.3. Determinação das propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas das partículas sintetizadas foram determinadas por ensaios de magnetização da amostra vibrante (MAV), operando com campos magnéticos entre -20 e 20 kOe, realizadas no

Departamento de Física (LFFS) da Universidade Federal de Santa Catarina, utilizando um magnetômetro da marca Magnet Systems®, modelo 3473-70 Eletromagnet.

### **3.2.4. Determinação da composição química**

A identificação das ligações e dos grupos funcionais presentes nos suportes foi feita através da análise de espectros de absorção realizadas em um espectrômetro infravermelho com transformada de Fourier de um sistema de refletância total atenuada (FTIR-ATR) em um espectrofotômetro modelo AGILENT TECHNOLOGIES – Cary 600 Series FTIR Spectrometer, na Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina.

### **3.2.5. Imobilização da TLL no suporte NPM-SDS**

Para imobilização, foi utilizado 0,5 g de cada um dos suportes NPM-SDS e adicionados 10 mL de solução de NaCl de concentração 1 g/L e 0,5 mL do preparado enzimático. As concentrações para cada suporte serão discutidas posteriormente. Essa mistura foi agitada continuamente a 300 rpm à temperatura ambiente. Após, as partículas foram separadas com um uso de uma barra magnética e lavadas com água destilada, até não restar resíduos de proteínas dissolvidas e o derivado foi posteriormente liofilizado.

Durante a imobilização, foram recolhidas alíquotas de 200 µL do sobrenadante, a cada 30 minutos, para, desta forma, acompanhar o decréscimo da atividade enzimática no sobrenadante. Quando a proteína do sobrenadante permaneceu constante, considerou-se que a imobilização estava concluída.

### **3.2.6. Teor de proteínas do preparado enzimático comercial TLL**

A determinação do teor de proteínas do preparado enzimático comercial foi feita pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), baseado na interação entre o corante “Coomassie brilliant blue” BG-250 e macromoléculas de proteínas. A interação entre a proteína de alta massa molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma iônica, que absorve fortemente em 595 nm. Foi adicionada

em um Eppendorf uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de sobrenadante e 2 mL de reagente de Bradford. Esperou-se 20 minutos e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi modelo U-2900).

O teor de proteínas foi determinado a partir da elaboração da Curva-padrão da Absorbância no comprimento de onda 595 nm de amostras com concentrações conhecidas de BSA (albumina do soro bovino) misturadas com o reagente de Bradford. A partir da curva-padrão (Anexo 1) chegou-se na Equação 1.

$$C_p = \left( \frac{Ab_{595} - 0,0892}{0,8160} \right) \quad \text{Equação 1}$$

Em que:

$C_p$  = Concentração de proteínas [mg/mL];

$Ab_{595}$  = Absorbância medida no comprimento de onda 595 nm.

### 3.2.7. Determinação de atividade hidrolítica da lipase

Para medir a atividade hidrolítica da lipase livre ou imobilizada, foi utilizado um método colorimétrico, sendo feita a hidrólise enzimática do butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB), obtendo-se como produto o *p*-nitrofenol (*p*-NP), um composto de coloração amarela. A formação desse produto produz um aumento de absorbância em 348 nm.

Para as análises, amostras de 20  $\mu\text{L}$ , de solução de sobrenadante com enzimas livres ou da dispersão com enzimas imobilizadas em nanopartículas, foram adicionadas a 20  $\mu\text{L}$  de *p*-NPB 50 mM e 2,5 mL de solução tampão de fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0). As amostras foram agitadas em vórtex por 2 minutos, para reagirem, à temperatura de 25 °C e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi modelo U-2900). Para calcular a atividade hidrolítica do meio reacional foi utilizada a Equação 2.

$$A_h = \frac{\sigma}{\varepsilon \cdot c} \cdot f_d \cdot 10^{-3} \quad \text{Equação 2}$$

Em que:

$A_h$  = Atividade hidrolítica do meio reacional (U/L);  
 $\sigma$  = Coeficiente angular da reta absorbância versus tempo ( $\text{min}^{-1}$ );  
 $f_d$  = Fator de diluição da amostra (127 mL/mL)  
 $\varepsilon$  = Coeficiente de extinção molar do produto ( $5,15 \mu\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ );  
 $c$  = caminho óptico (1 cm).

Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a reação com velocidade de formação de 1 micromol de produto por minuto.

### 3.2.8. Atividade específica do derivado enzimático

Para calcular a atividade específica do derivado enzimático foi utilizada a Equação 3, em que é relacionada a atividade hidrolítica total (U) com a massa de proteína imobilizada.

$$A_{h,e} = \frac{A_h \cdot V_r}{m_{p,d}} \quad \text{Equação 3}$$

Em que:

$A_{h,e}$  = atividade hidrolítica específica do derivado enzimático [U/mg];

$A_h$  = atividade hidrolítica do meio reacional (U/L);

$V_r$  = volume do meio reacional (L);

$m_{p,d}$  = massa de proteína imobilizada no derivado enzimático (mg).

### 3.2.9. Rendimento da imobilização

O rendimento teórico da imobilização da atividade enzimática foi quantificado com base na diferença entre a atividade enzimática de hidrólise do sobrenadante no início e ao final do período de imobilização, conforme Equação 4.

$$RI_a = \left(1 - \frac{A_{h,f}}{A_{h,o}}\right) \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Em que:

$RI_a$  = Rendimento teórico da imobilização da atividade enzimática de hidrólise (%);

$A_{h,f}$  = Atividade enzimática de hidrólise total do sobrenadante ao final da imobilização (U);

$A_{h,o}$  = atividade enzimática de hidrólise total do sobrenadante no início da imobilização (U).

O rendimento de imobilização também foi quantificado com base na quantidade de proteína adsorvida pelo suporte NPM-SDS, conforme Equação 5.

$$RI_p = \left( \frac{M_{p,i}}{M_{p,t}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Em que:

$RI_p$  = Rendimento efetivo da imobilização de proteínas (%);

$M_{p,i}$  = Massa de proteína imobilizada (mg);

$M_{p,t}$  = Massa de proteína total no sobrenadante no início do processo de imobilização (mg).

Outra forma de quantificar experimentalmente o rendimento de imobilização foi por meio da atividade recuperada, definida como a relação entre a atividade de hidrólise total do derivado enzimático ao final da imobilização e atividade de hidrólise total disponível inicialmente no sobrenadante, conforme Equação 6.

$$AR = \left( \frac{A_{h,t}}{A_{h,o}} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação 6}$$

Em que:

$AR$  = atividade recuperada (%);

$A_{h,t}$  = atividade hidrolítica total do derivado enzimático (U);

$A_{h,o}$  = atividade enzimática de hidrólise total do sobrenadante no início da imobilização (U).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (NPM-OX) PRODUZIDAS E MODIFICADAS SUPERFICIALMENTE COM SDS.

As NPM-OX foram preparadas e modificadas superficialmente com diferentes quantidades de SDS. Ao todo foram sintetizados cinco suportes, com as razões molares NPM-OX:SDS partindo de 1:1 e seguindo a sequência de 5:1, 10:1, 15:1 e 20:1 (que é a concentração micelar crítica do SDS), A razão molar 10:1 é a referenciada na literatura por Lee et al (2009).

Durante a síntese das NPM-OX é necessário se atentar ao ajuste de temperatura e de pH. Henriques (2016) observou que quando a temperatura de precipitação foi menor do que 67 °C houve a formação de um produto de aspecto pastoso.

Segundo Bork (2016), a síntese do suporte de NPMs em presença de oxigênio dissolvido favorece a transformação parcial de magnetita em maguemita, além da formação de hematita, sendo estes os principais contaminantes presentes no produto. Para assegurar a síntese de magnetita sem os contaminantes supracitados, o autor utilizou em seus estudos tratamento com borbulhamento de nitrogênio gasoso, mesmo método utilizado neste trabalho.

Deve haver atenção quanto à desoxigenação e a adição de hidróxido de amônio, pois ao sintetizar nanopartículas na presença de oxigênio e com quantidade insuficiente de hidróxido de amônio, há favorecimento para formação de maguemita. Segundo Henriques (2016), a eficiência das etapas de síntese pode ser visualizada por meio da coloração das partículas, sendo a cor preta para formação de magnetita e a cor castanho avermelhado para formação de maguemita.

Após a modificação, foram analisadas as propriedades magnéticas e a identificação dos grupos funcionais de cada suporte, para poder confirmar se a magnetização se mantém, mesmo após a modificação superficial, e para poder constatar que há substituição dos grupos do oxalato pelos de SDS.

Sobre os mecanismos de imobilização, os resultados de Henriques (2016), que imobilizou TLL em suportes de magnetita modificadas com oxalato, após teste de dessorção, demonstrou que ao adicionar soluções de detergente foi possível remover parte da lipase adsorvida, comprovando que o mecanismo de imobilização foi adsorção hidrofóbica.

Após a modificação superficial foram determinadas as concentrações de proteína durante a reação de imobilização e a determinação das atividades enzimáticas tanto do sobrenadante quanto do derivado enzimático.

#### 4.1.1. Propriedades magnéticas do suporte NPM-SDS.

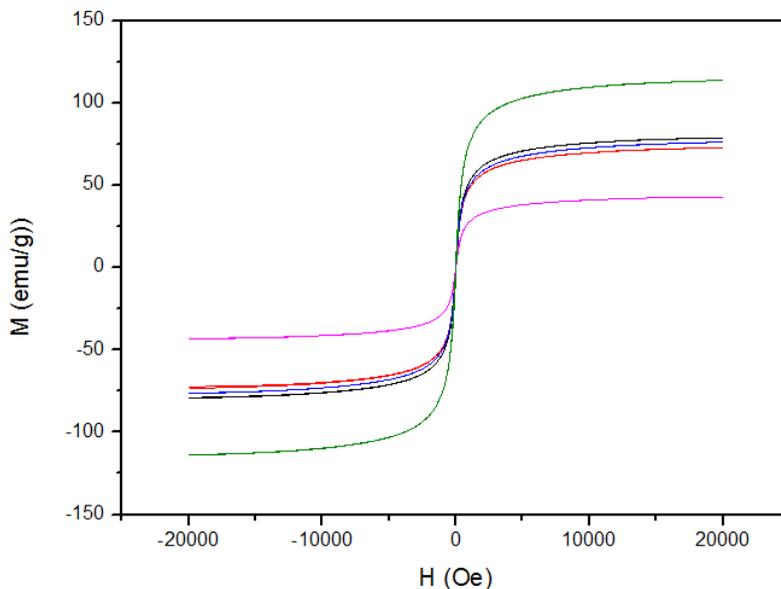
As propriedades magnéticas dos suportes foram analisadas através das curvas de magnetização, onde foram obtidos os valores de coercividade ( $H_c$ ), magnetização remanente ( $M_r$ ) e magnetização de saturação ( $M_s$ ), conforme mostra a Tabela 3.

Tabela 3– Valores de coercividade ( $H_c$ ), magnetização remanente ( $M_r$ ) e magnetização de saturação ( $M_s$ ) para todos os suportes.

Suporte	Razão molar (Magnetita:SDS)	$H_c$ (KOe)	$M_r$ (emu/g)	$M_s$ (emu/g)
1	1:1	0,176	0,0326	76,90
2	5:1	0,162	0,0210	69,95
3	10:1	0,131	0,0099	73,59
4	15:1	0,149	0,0204	41,57
5	20:1	0,182	0,0258	108,48

Os valores baixos de  $H_c$  e  $M_r$  de todas as amostras indicam um comportamento superparamagnético. Em todos os suportes é possível observar, por meio de gráfico de magnetização mostrado na Figura 10 que a magnetização remanente ( $M_r$ ) é zero quando a coercividade ( $H$ ) também é zero. A ausência de histerese indica a ausência de forças dipolo-dipolo fortes entre as nanopartículas de magnetita, típicas de partículas superparamagnéticas (HENRIQUES et al 2018; FARAJI, 2010).

Figura 10 - Curvas de magnetização dos suportes de NPM-OX:SDS.



Linha preta: suporte 1(1:1); linha vermelha: suporte 2 (5:1); linha azul: suporte 3 (10:1); linha rosa: suporte 4 (15:1); linha verde: suporte 5 (20:1).

Henriques (2016) chegou a valor de  $M_r$  de 0,022 emu/g e Bork (2016) encontrou 0,026 emu/g, sendo que os dois autores sintetizaram NPMs modificadas superficialmente com SDS, comprovando que os valores encontrados neste trabalho condizem com a de estudos similares. Os valores de  $H_c$  também são compatíveis com os da literatura, sendo 0,237 e 0,25 KOe os valores a que chegaram Bork (2016) e Henriques (2016). O valor de  $M_s$  para magnetita costuma variar entre 60 a 90 emu/g (CHIOLERIO et al., 2014).

Os suportes 1, 2 e 3 se encaixam perfeitamente dentro desse valor. A diminuição da magnetização de saturação é provavelmente devido à existência de surfactantes na superfície da nanopartícula magnética. Lee et al (2009), ao sintetizar NPMs funcionalizadas com SDS; encontrou um valor para  $M_s$  de 77 emu/g, bem próximos dos encontrados nesta análise. Henriques (2016) chegou a um  $M_s$  de 55,0 emu/g ao modificar superficialmente as NPM-OX com SDS e Bork (2016) encontrou um valor de magnetização de saturação de 52,4 emu/g, sendo que a razão molar que autores utilizaram são diferentes das estudadas neste trabalho, sendo elas 1:2 e 2:1, respectivamente. A possível explicação para baixo

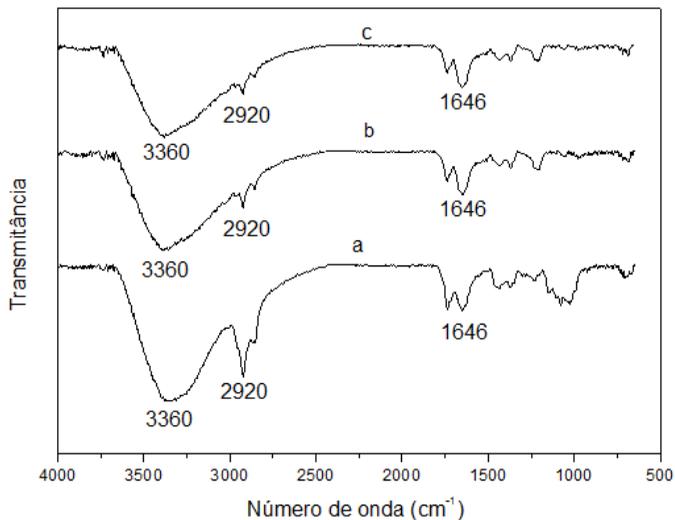
valor de  $M_s$  do suporte 4 pode ser devido a oxidação do suporte durante sua modificação superficial, ocasionando a diminuição da emissão. Já o suporte 5 possui um  $M_s$  de 108,48 emu/g o que se aproxima muito de valores de líquido magnético comerciais (LEE et al, 2009), que tem valores em torno de 123 emu/g, pois esse suporte é o que apresenta menor concentração de SDS.

#### **4.1.2. Identificação de grupos funcionais nos suportes NPM-SDS**

Para identificar e caracterizar os grupos funcionais foram feitas análises de FTIR, e os resultados obtidos para os suportes de NPM-SDS funcionalizados com diferentes razões molares de SDS:NPM estão apresentados nas Figuras 11 e 12.

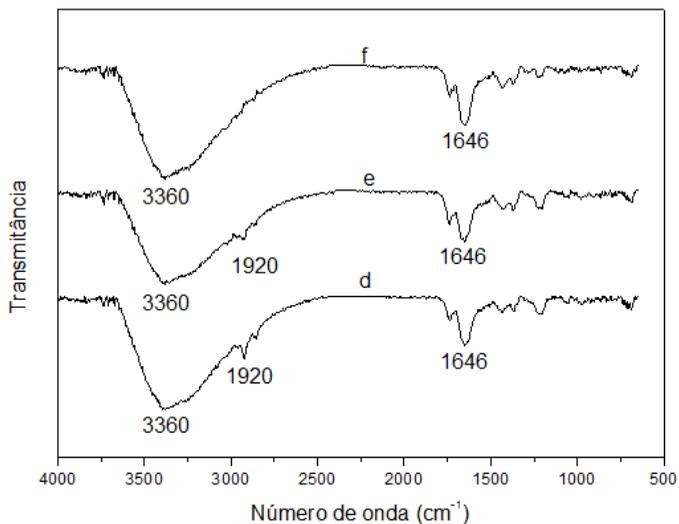
Em todos os suportes a banda  $3360\text{ cm}^{-1}$  aparece, o que indica presença de hidroxilas, mostrando que os suportes adquiriram umidade durante a síntese de NPM-OX. A banda de  $2920\text{ cm}^{-1}$  está presente em todas as amostras que sofreram modificação superficial, e é atribuída ao estiramento das ligações C-H das carbonilas do SDS, o que indica a presença de SDS na superfície da NPM. É possível identificar que na amostra 20:1 esse pico é bem suave, pois há menor concentração de SDS, enquanto na amostra 1:1 esse pico é o mais destacado, pois há maior concentração de SDS. O comprimento de onda entre  $1646$  e  $1428\text{ cm}^{-1}$  indicam a vibração entre os estiramentos simétricos e assimétricos dos ânions dicarboxílicos ( $\text{CO}^{-2}$ ) que estão presentes no oxalato. Apesar de esse pico ser suave nas cinco amostras, ele indica que não houve total substituição do oxalato pelo SDS. Na amostra 1:1 em que o pico  $2920\text{ cm}^{-1}$  é mais acentuado, a banda  $1646\text{ cm}^{-1}$  aparece sutilmente, demonstrando que quanto maior a concentração de SDS na síntese, maior é a substituição de oxalato por SDS e menor é a presença de oxalato. É possível identificar que a banda  $2920\text{ cm}^{-1}$  não aparece no suporte sem a modificação superficial (NPM-OX), comprovando que não há SDS (LEE et al 2009; HENRIQUES et al, 2018; SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

Figura 11– Espectro de FTIR dos suportes de NPM modificadas superficialmente com SDS com razões molares 1:1, 5:1 e 10:1.



\*(a) suporte 1 (1:1); (b) suporte 2 (5:1) e (c) suporte 3 (10:1)

Figura 12– Espectro de FTIR suportes modificados superficialmente com SDS com razões molares 15:1, 20:1 e NPM-OX.



\*(d) suporte 4 (15:1); (e) suporte 5 (20:1); (f) suporte NPM-OX

A partir da análise de espectro de FTIR é possível verificar que houve substituição do oxalato pelo SDS, caracterizando os suportes hidrofobicamente. Henriques et al (2018), Bork (2016) e Lee et al (2009) obtiveram resultados bem similares em suas análises de espectro de FTIR, indicando que apesar do oxalato não ser totalmente substituído pelo SDS, todos conseguiram imobilização da lipase. Outro fator positivo encontrado, foi a comprovação da otimização de tempo do processo, pois o tempo de reação para funcionalização neste trabalho foi de 6 horas, enquanto nos anteriores era de 24 horas, demonstrando que a redução do tempo de síntese não afeta negativamente a substituição do oxalato pelo SDS. A principal diferença observada no resultado das amostras foi em relação a menor ou maior razão molar, obtendo uma maior substituição de SDS na razão molar 1:1 e uma menor substituição de SDS na razão molar 20:1, o que já era esperado, pois há maior quantidade de SDS disponível para modificação.

#### **4.2. IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS TLL NOS SUPORTES NPM-SDS**

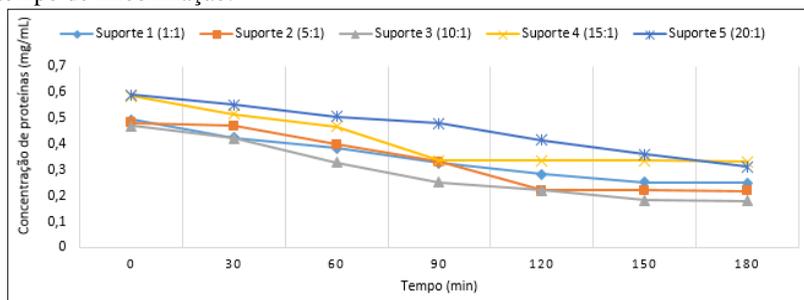
A imobilização da lipase foi feita com o suporte de NPM:SDS previamente seco por meio da liofilização. A concentração de proteínas no sobrenadante da solução enzimática durante o processo de imobilização, para cada suporte, foi acompanhada e é apresentada na Figura 13<sup>1</sup>.

A partir da Figura 13 é possível perceber que a imobilização ocorre em tempos distintos para cada suporte. No suporte 5, após 180 minutos a concentração de proteínas não ficou constante, decaindo de 0,590 para 0,313 mg/mL, indicando que a imobilização não estava concluída neste tempo. No suporte 2 a imobilização ocorreu após 120 minutos. Tanto no suporte 1 quanto no suporte 3 após 150 minutos a concentração de proteínas no sobrenadante se manteve constante em 0,250 e 0,180 mg/mL, respectivamente. Já o suporte 4, com apenas 1 hora e meia de imobilização, a concentração de proteínas se estabilizou. Ou seja, a concentração de SDS afeta o tempo de imobilização, visto que as amostras tiveram tempos distintos de imobilização.

---

<sup>1</sup> Estes dados dos gráficos também podem ser observados em tabelas disponíveis no Anexo.

Figura 13 - Concentração de proteínas (mg/mL) no sobrenadante em função do tempo de imobilização.



Esses resultados indicam um suporte com condições favoráveis à imobilização de lipases de TLL, sem importar a razão molar, visto que a concentração de proteínas no sobrenadante foi diminuída em todas as razões molares. Outra observação é quanto à concentração de SDS, em que as amostras de razões molares 5:1 e 10:1 obtiveram os melhores resultados de imobilização – isto se desconsiderarmos a amostra 5, pois não foi possível concluir o tempo necessário para a concentração de proteínas se manter constante, o que pode ser devido a baixa quantidade de SDS, logo, não se pode afirmar com certeza a quantidade de proteínas imobilizadas.

Esses resultados mostram que o suporte, ao sofrer a modificação, obteve as características necessárias para criar uma afinidade entre o núcleo magnético e a enzima, permitindo a fixação da lipase na superfície do suporte.

A Tabela 5 indica as quantidades de proteínas adsorvidas nos diferentes suportes.

A partir dos dados da Tabela 4 é possível verificar que a porcentagem de proteína imobilizada variou entre 42,7 e 61,5%, dependendo do suporte. Em todos os suportes da Tabela 5, foram utilizados 0,5g de NPM-SDS e o volume de TLL foi de 0,5 mL. A concentração inicial das proteínas em solução para cada suporte foi medida pelo método de Bradford.

Tabela 4 – Quantidade de proteínas adsorvidas nos diferentes suportes sintetizados à temperatura ambiente, 300 rpm, 3,5 h de reação e volume reacional de 10 mL de solução.

Suporte	Razão molar	$C_{p,o}$ (mg/mL)	$M_{p,t}$ (mg)	$M_{p,i}$ (mg)	$RI_p$ (%)	$C_{p,s}$ (mg/g <sub>suporte</sub> )
1	1:1	0,494	4,94	2,44	49,4	4,88
2	5:1	0,481	4,81	2,62	54,5	5,24
3	10:1	0,471	4,71	2,90	61,6	5,80
4	15:1	0,585	5,85	2,50	42,7	5,00
5	20:1	0,590	5,90	2,77	46,9	5,54

$C_{p,o}$  = concentração inicial de proteínas em solução;  $M_{p,t}$  = massa de proteína total no sobrenadante;  $M_{p,i}$  = massa de proteína imobilizada;  $RI_p$  = rendimento protéico da imobilização;  $C_{p,s}$  = concentração de proteína adsorvida no suporte.

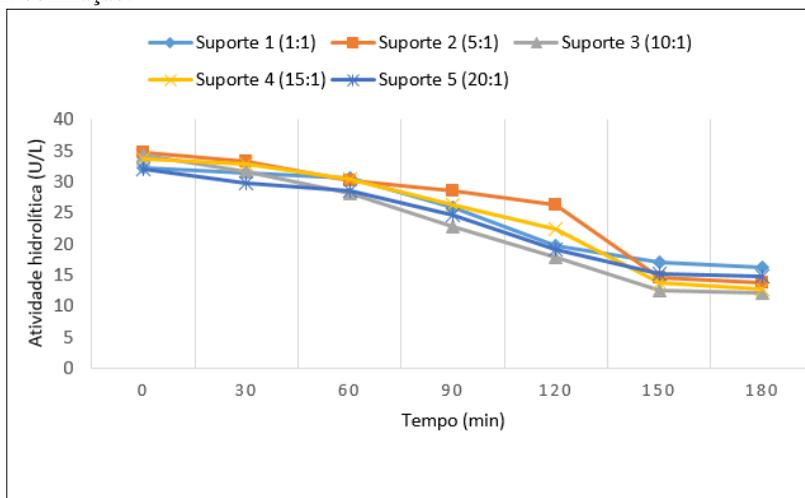
O suporte que teve maior rendimento foi o de razão molar 10:1, tendo com capacidade máxima de proteína imobilizada 5,80 mg de proteína para cada grama de suporte, com rendimento máximo de 61,6%. Como as condições experimentais foram as mesmas em todos os testes, a concentração de SDS utilizada serve para determinar uma maior ou menor quantidade de proteína imobilizada. Bork (2016), imobilizou a lipase RM e percebeu que ao utilizar uma menor concentração de enzimas, obteve um maior rendimento de imobilização, sendo os valores do autor variaram entre 80, 71,82 e 40% de rendimento ao utilizar concentrações de 0,33 mg/mL, 0,47 mg/mL e 0,62 mg/mL – lembrando que o autor utilizou uma razão molar de magnetita/SDS de 2:1. A explicação do autor para essa diminuição de rendimento ao aumentar a concentração de enzimas se dá pelo fato de que concentrações maiores de enzimas sofrem maior influência do mecanismo de precipitação por ligação cruzada do que a adsorção física, o que não é o desejável. Henriques (2016) obteve valores de rendimento de 86 a 51,0%, variando também a concentração de enzimas, sendo seu melhor rendimento (86%) ao utilizar a concentração de 2,2 mg de enzimas por mL de solução – a autora utilizou uma razão molar de magnetita/SDS de 1:2. O suporte com menor concentração de SDS obteve um bom resultado de concentração de proteínas adsorvidas (5,54 mg/g suporte), enquanto o suporte com maior concentração de SDS foi a que apresentou pior resultado (4,88 mg/g de suporte), concluindo-se que a adição demasiada de SDS, nas condições experimentais analisadas, não propicia um suporte eficiente para adsorção da lipase. Consequentemente, dentro das condições experimentais, o suporte que

apresenta concentração média de SDS (10:1) foi a que conseguiu obter maior capacidade de imobilização de enzima.

#### 4.3. CINÉTICA E RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO ENZIMÁTICA

A Figura 14 apresenta a cinética do decaimento da atividade hidrolítica do sobrenadante no processo de imobilização da enzima TLL no suporte desenvolvido NPM-SDS. Esse decaimento visa comprovar a imobilização.

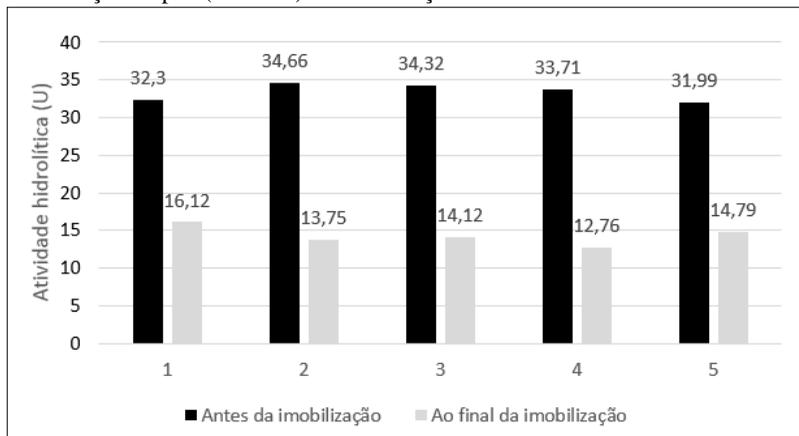
Figura 14 - Atividade hidrolítica (U/L) do sobrenadante em função do tempo de imobilização.



A partir dos dados da Figura 14 – é possível observar esses dados em forma de tabela nos Anexos – percebe-se que há diminuição da atividade hidrolítica do sobrenadante em relação ao tempo. Essa variação ocorre devido a diminuição de enzimas livres no sobrenadante, visto que as enzimas estão sendo adsorvidas pelo suporte, comprovando a imobilização.

A Figura 15 mostra a atividade hidrolítica do sobrenadante no início da imobilização e após a imobilização (180 min), demonstrando o decaimento da atividade, comprovando que as lipases foram adsorvidas pelo suporte.

Figura 15 - Atividade hidrolítica enzimática do sobrenadante antes da imobilização e após (180 min) a imobilização.



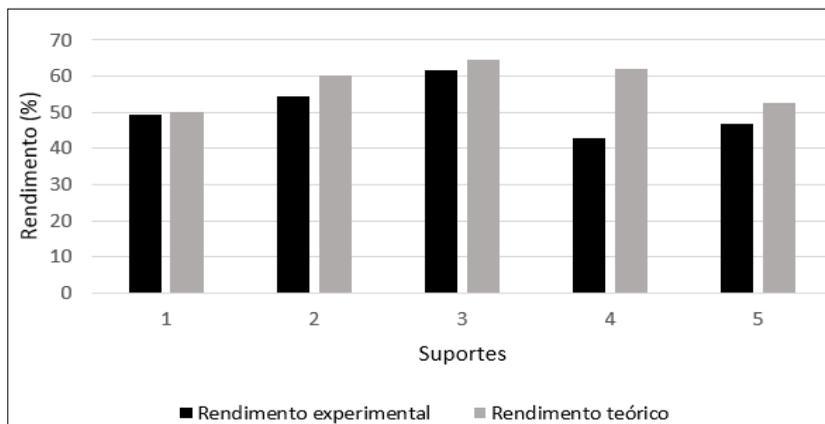
\*Atividade hidrolítica do sobrenadante no início e ao final da imobilização, nos suportes 1, 2, 3, 4 e 5 com razões molares magnetita/SDs de 1:1, 5:1, 10:1, 15:1 e 20:1, respectivamente.

O rendimento teórico da imobilização está associado à quantidade de atividade do sobrenadante que teoricamente foi transferida para o suporte. Supostamente a quantidade de atividade transferida é proporcional à quantidade de proteínas que foi efetivamente transferida. Assim, a Figura 16 mostra uma comparação entre o rendimento teórico da imobilização calculado com base na atividade enzimática ( $RI_a$ ) e o rendimento de imobilização calculado com base na transferência de proteínas ( $RI_p$ ).

O rendimento teórico apresentado foi sempre maior do que o rendimento experimental de proteínas, sendo uma das justificativas desse resultado a ativação do sítio ativo da enzima pelo SDS. Mesmo alguns suportes terem adsorvido uma boa quantidade de lipases, deve-se observar se os sítios ativos dessas lipases foram realmente expostos ao substrato, o que caracteriza um aumento da atividade hidrolítica. A maior variação analisada em relação às diferenças entre o rendimento teórico e o experimental foi no suporte 5, com variação de 31,24%, e a menor variação foi observada no suporte 4, com variação de apenas 4,82%. O suporte 5 teve pouca porcentagem de proteínas adsorvidas (42,7%), porém teve um bom desempenho em relação ao rendimento teórico (62,1%), o que pode indicar que a quantidade de SDS no suporte não foi

suficiente para conseguir adsorver mais proteínas, porém as proteínas adsorvidas tiveram seu sítio ativo exposto de forma a conseguir hidrolisar eficientemente o substrato

Figura 16 – Rendimento teórico de imobilização da atividade e rendimento efetivo de imobilização de proteínas nos suportes NPM-SDS.



\*Rendimento teórico de imobilização de atividade enzimática e rendimento experimental de imobilização de proteínas, em porcentagem, para suportes de 1 a 5, com razões molares Magnetita/SDS de 1:1, 5:1, 10:1, 15:1 e 20:1 respectivamente.

Esses valores indicam um rendimento teórico máximo de imobilização de 64,69% no suporte 4, porém, o suporte 3 teve um rendimento teórico bem parecido, de 60,33%. Os suportes 1 e 2 tiveram um rendimento teórico médio de 51%. Os valores indicam os suportes 3 e 4 como os com melhores resultados em relação a porcentagem de imobilização, corroborando os resultados de transferência de atividade e de proteínas, isto é, esses suportes conseguiram uma boa adsorção de proteínas e um bom desempenho em relação a atividade enzimática, o que indica que a quantidade de SDS utilizada auxiliou tanto na adsorção de lipases durante a imobilização quanto na exposição do sítio ativo durante a reação de hidrólise.

#### 4.4. ATIVIDADE HIDROLÍTICA DOS DERIVADOS ENZIMÁTICOS

As atividades hidrolíticas, atividades hidrolíticas totais e atividades específicas dos derivados enzimáticos para cada suporte são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 5 - Atividade hidrolítica do derivado enzimático (U/L), atividade hidrolítica total do derivado enzimático (U) e atividade hidrolítica específica do derivado enzimático (U/mg) para cada suporte.

<b>Suporte</b>	<b>Razão molar Mag./SDS</b>	<b>A<sub>h</sub> (U/L)</b>	<b>A<sub>h,t</sub> (U)</b>	<b>A<sub>h,e</sub> (U/mg prot.)</b>
1	1:1	35,17	369,36	151,37
2	5:1	44,01	462,19	176,40
3	10:1	45,64	479,28	165,27
4	15:1	25,56	268,38	107,35
5	20:1	28,97	304,24	109,83

\*A<sub>h</sub> = atividade hidrolítica do derivado enzimático (U/L); A<sub>h,t</sub> = atividade hidrolítica total do derivado enzimático (U); A<sub>h,e</sub> = atividade hidrolítica específica do derivado enzimático (U/mg).

A atividade específica da enzima livre calculada foi de 90,17 U/mg de proteína, enquanto a atividade específica do derivado enzimático, após secagem e liofilização do suporte, variaram entre 107,35 e 176,40 U/mg. Os suportes com razão molar 5:1 e 10:1 foram os que apresentaram maior atividade específica com fator de ativação de 1,95 e 1,83 vezes, respectivamente, em relação à enzima livre, e com valores de atividade de 176,40 e 165,27 u/mg de proteína. Os derivados enzimáticos que apresentaram menores atividades foram os do suporte 4 e 5, com razão molar 15:1 e 20:1, com fator de ativação de 1,19 e 1,21 vezes, respectivamente, ou seja, com atividade específica praticamente igual ao da enzima livre.

Bork (2016) observou que a atividade hidrolítica das lipases de RM e Cal B adsorvidas no suporte NPM-SDS apresentaram resultados semelhantes e ao comparar com enzimas comerciais, a variedade comercial apresentou valor inferior à mesma imobilizada no suporte paramagnético.

Em seus estudos, Henriques (2018) concluiu que o derivado enzimático NPM-SDS para imobilizar TLL mostrou uma hiperativação no fator de 3 vezes em relação a sua atividade inicial.

Lee et al (2009) também observou um aumento na atividade específica da lipase PPL imobilizada em suporte de NPM-SDS em relação à enzima livre. O autor encontrou uma atividade enzimática máxima ao utilizar uma concentração inicial de lipase de 0,8 mg/mL e observou em seus estudos que ao aumentar a concentração acima desse valor a atividade enzimática diminuiu, chegando a conclusão que o excesso de enzimas dificulta a conversão do substrato do substrato devido a interação proteína-proteína.

Os resultados encontrados na Tabela 5 demonstram que há uma quantidade ideal de SDS na reação de modificação superficial do suporte NPM-OX para imobilização da lipase TLL dentro das condições experimentais utilizadas, indicando que muito SDS (suporte 1) ou pouco SDS (suporte 4 e 5) afetam em uma atividade específica menor quando comparado com os suportes com uma quantidade média de SDS (suporte 2 e 3). A explicação para esses valores pode ser devido a uma menor substituição do grupo lauril sulfato (demonstrada pela análise de espectro de FTIR), nos suportes com menor quantidade de SDS na reação de modificação superficial, o que por consequência pode gerar uma menor afinidade da enzima pelo suporte e também uma menor atividade hidrolítica.

Outro fator que pode ter colaborado para esse aumento da atividade enzimática pode ser a secagem do derivado antes da reação de hidrólise. Henriques (2016) observou em seus estudos que após a secagem e liofilização dos suportes imobilizados, a atividade específica do seu derivado teve um aumento. Ela atribui esse aumento da atividade enzimática a uma menor aglomeração das partículas quando liofilizadas, deixando a lipase mais disponível ao meio reacional do que no derivado ainda em solução aquosa.

A Tabela 9 mostra os valores das atividades recuperadas e o fator de ativação, comparadas com a enzima livre, demonstrando o aumento da atividade enzimática.

Tabela 6– Atividade Recuperada para cada suporte.

<b>Suporte</b>	<b>Razão Molar</b>	<b>AR (%)</b>	<b>FA</b>
1	1:1	108,89	1,67
2	5:1	127,00	1,95
3	10:1	132,97	1,83
4	15:1	75,82	1,19
5	20:1	90,55	1,21

FA = fator de ativação da enzima imobilizada em comparação à enzima livre; AR = atividade recuperada (%).

Na grande maioria das vezes, a imobilização enzimática tende a diminuir a atividade específica de uma enzima no derivado, entretanto, a lipase tem a característica de sofrer ativação interfacial ao interagir com interfaces hidrofóbicas (PALOMO *et al*, 2007). Ou seja, o mecanismo de imobilização por meio das zonas hidrofóbicas da lipase favorece um aumento na atividade enzimática, concluindo-se que as características do suporte sintetizado ativaram o sítio ativo da enzima, isto é, ao ser adsorvido em um suporte modificado superficialmente com surfactante teve seu sítio ativo exposto (ativação interfacial), fornecendo livre acesso ao substrato ( $\rho$ -PNB).

## 5. CONCLUSÃO

Todos os suportes apresentaram características superparamagnéticas, sem curva de histerese, o que gerou suportes com grande facilidade de separação. Com base na análise FTIR, foi possível identificar que houve substituição de íons de oxalato por lauril sulfato de sódio (SDS), tornando os suportes com as características hidrofóbicas desejadas.

As análises de espectro de FTIR também que 6 horas de reação foram suficientes para a substituição dos grupos funcionais oxalato pelo grupo lauril sulfato. Esse resultado é bastante positivo, pois apresenta uma redução de custos de processo ao reduzir o tempo de reação.

Todos os suportes apresentaram resultados positivos quanto à imobilização, demonstrando que as condições de síntese escolhidas – tempo de reação e escolha do SDS como surfactante – modificaram superficialmente as NPMs e foram favoráveis às características peculiares da lipase.

De todos os suportes estudados, os que apresentaram melhores resultados tanto no rendimento de imobilização quanto na atividade da enzima foram os suportes com razões molares de NPM:SDS de 5:1 e 10:1, respectivamente.

Os resultados demonstram que há uma quantidade ótima de adição de SDS na síntese de modificação superficial, sendo que os resultados dos suportes com pouco SDS demonstraram baixo rendimento de enzima imobilizada ao suporte. Já, quando na reação de modificação, foi utilizada uma maior quantidade de SDS, a atividade hidrolítica não alcançou o melhor resultado.

Para trabalhos futuros sugere-se fazer a análise de estabilidade térmica e de pH para os derivados enzimáticos além de avaliar a reutilização dos derivados enzimáticos ; avaliar a influência do uso de ultrassom na ativação das partículas para a imobilização enzimática; avaliar efeitos de outros surfactantes na imobilização de lipases TLL e utilizar outros tipos de lipases para estudar seus desempenhos em condições experimentais semelhantes .



## REFERÊNCIAS

- AUGUSTUS, G.; RIBEIRO, P. As Propriedades Magnéticas da Matéria: um Primeiro Contato. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, 2000.
- BERRY, C.C.; CURTIS, A.S.G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied physics**, 2003.
- BIER, M. Lipases. **Methods in Enzymology**, v.1, p. 627-642, 1955.
- BLANCH, H. W.; CLARK, D. S. Biochemical Engineering. Boca Raton: **Taylor & Francis Group**, 1997.
- BORK, J.A **Síntese em ultrassom de nanopartículas paramagnéticas de magnetita modificadas com lauril sulfato de sódio para imobilização de lípases**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p. 168. 2016.
- 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**, v. 72, p. 248–254, 1976.
- BRENA, B. M.; BATISTA-VIERA, F. Enzyme Immobilization Literature Survey. In: GUIBAN, J. M. Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells. [S.l.]: **Humana Press**, v. 22. p. 15-30. 2006.
- BRZOSOWSKI, A.M.; SAVAGE, H.; VERMA, C.S.; TURKENBURG, J.P.; LAWSON, DM.; SVENDESEN. A.; PATKAR, S. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15071–15082, 2000.
- BUCAK, S.; ALTAN, C.L. Chapter 6: Magnetic nanoparticles and cancer. **Nanotechnology in Cancer**, p. 105-137, 2017.
- BUKHARI, A.; IDRIS, A.; ATTA, M.; LOONG, T.C. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. **Chinese Journal of Catalysis**, v.35, p.1555-1564, 2014.

CHEN,Z.; LIUL.; YANG,R. Improved performance of immobilized lipase by interfacial activation.on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. **RSC Advances**, v.87, p.2538-2545, 2017

CHIOLERIO, A. et al.Magnetite and Other Fe-Oxide Nanoparticles. In: BHUSHAN, B. et al. (Eds). **Handbook of Nanomaterials properties**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014. P. 213-246.

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

FARAJI, M.; YAMINI, Y.; REZAEE, M. Magnetic Nanoparticles: synthesis, stabilization, funcionalization characterization and applications. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, n.1, p. 1-37, 2010.

FARIA, R.N.; LIMA, L.F.C.P. **Introdução ao magnetismo dos materiais**. p. 198, 2005.

FERNANDES, R.A.; SILVA, A,L,D.; TAVARES, A.P.M.; XAVIER, A.M.R.B. EDTA-Cu(II) chelating magnetic nanoparticles as a support for laccase immobilization. **Chemical Engineering Science**, v.158, p.599-605, 2017.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. et al. Immobilization of lipases by selective adsorption on hydrophobic supports. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 93, n. 1-2, p. 185–197, 1998.

FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as na industrial biocatalyst. **Jornaul of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.62, p. 197-212, 2010.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Effect of the immobilization protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase Ultra. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 3–4, p. 99–104, 2007.

FONTANIVE, V.C.P.; KHALIL, N.M.; COTICA, L.F.; MAINARDES, R.M. . Aspectos biológicos de nanopartículas de ferritas magnéticas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.35, n.4, p.549-558, 2014.

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

HASAN, F.; SHAH, A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, p.235-251, 2006.

HENRIQUES, R.O. **Desenvolvimento de metodologias para Imobilização e Coimobilização de Enzimas de Nanopartículas magnéticas**. Tese (Doutorado em Engenharia Química). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. p.172. 2016.

HENRIQUES, R.O.; BORK, J.A.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUISAN, J.M.; FURIGO JR, A.; OLIVEIRA, D.; PESSELA, B.C. Co-immobilization of lipases and  $\beta$ -D-galactosidase onto magnetic nanoparticle supports: Biochemical characterization. **Molecular catalysis**, v. 453, p. 12-21, 2018.

HONG, J.; FENG, B.; LIU, G.; LI, H.Z.; DING, J.M.; ZHENG, Y.; WEI, D.G. Preparation and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polystyrene composite particles via inverse emulsion polymerization. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 476, p. 612-618, 2009.

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.

KARIMI, M. Immobilization of lipase onto mesoporous magnetic nanoparticles for enzymatic synthesis of biodiesel. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.8, p.182-188, 2016.

LAURENT, S. et al. Magnetic iron nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **American Chemical Society**, v. 108, p.2064-2110, 2008.

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

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.

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

MAHADIK, N.D; PUNTAMBEKAR, U.S; BASTAWDE, K.B; KHIRE, J.M; GOKHALEN, D.V. Production of acidic lipase by *Aspergillus niger* in solid state fermentation. **Process Biochemistry**, London, v.38, p.715-721, 2002.

MARTINEZ, G.A.L. **Síntese de nanopartículas magnéticas com elevada magnetização de saturação e elevada estabilidade química**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo. São Carlos. p.61, 2013.

MATEO, C.; PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; GUIBAN, J.M.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. . Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and microbial technology**, v.40, p. 1451-1463, 2007.

MESSIAS, J.M.; COSTA, B.Z.; LIMA, V.M.G.; GIESE, E.C.; DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M.. Microbial lipases: production, properties and biotechnological applications. Semina: **Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v.32, n. 2, p.213-234, 2011.

MIAO, C.; YANG, L.; WANG, Z.; LUO, W.; LI, H.; LV, P.; YUAN, Z. Lipase immobilization on amino-silane modified superparamagnetic

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Fuel**, v. 224, p. 774-782, 2018.

MILETIC, N.; ABETZ, V.; EBERT, K.; LOOS, K.. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B on Polystyrene Nanoparticles. **Macromolecular Journals**, v. 31, p.71-74, 2010.

MORAES, S.L; REZENDE, M.O.O. Determinação da concentração micelar crítica de ácidos húmicos por medidas de condutividade e espectroscopia. **Química Nova**, v.27, n. 5, p. 701- 704, 2004.

MOTTA, V.T. Bioquímica. 2 ed.São Paulo. p. 488 2011.

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.

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

OBER, C.A.; GUPTA, R.B. Nanoparticle technology for drug delivery. **Ideas CONCYTEG**, v 6, p. 714- 726, 2011.

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

PALOMO, J.M.; FERNANDEZ-LORENTE, G.; MATEO, C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; GUISAN, J.M. Interfacial adsorption of lipases on very hydrophobic support (octadecyl-Sepabeads): immobilization, hyperactivation and stabilization of the open form of lipases. **Jornaul of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.20, p. 279-286, 2002.

PANDEY, A. Solid-state fermentation. **Biochemical Engineering Journaul**, v; 13, p. 81-84, 2003.

Química Alkano,, disponível em <http://quimicaalkano.com/product/lauril-sulfato-de-sodio-polvo/>, acessado em 09 de junho de 2018.

REETZ, M.T. Lipases as practical biocatalysts. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 6, p. 145-150, 2002.

RIOS, N.S.; PINHEIRO, B.B.; PINHEIRO M.P.; BEZERRA, R.M.; SANTOS, J.C.S.; GONÇALVES, L.R.B. Biotechnological potential of lipases from *Pseudomonas*: sources, properties and applications. **Process Biochemistry**, 2018.

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.

SADIKU, M.N.O **Elementos de eletromagnetismo**, 5a edição, 2012.

SHARMA, R. CHISTI, Y; BANERJEE, U.C. Production, purification, characterization, applications of lipases. **Biotechnology Advances**, v.19, p.627-662, 2001.

SHELDON, R.A.; van PELT, S. Enzyme immobilization in biocatalysis, why, what and how. **Chemical Society Review**, v. 42, n.15, p.6223-6235, 2013.

SILVA, P.R. Interação forte e eletromagnetismo. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v.30, p.3305.1- 3305-5, 2008.

SILVERSTEIN, R.; WEBSTER, F. **Spectrometric Identification of Organic Compounds**, 1998.

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.

TIE, S.L. et al. Amino acid-coated nano-size magnetite particles prepared by two-step transformation. **Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.273, p. 75-83, 2006.

VILLENEUVE, P.; MURDERWA, J.; GRAILLE, J.; HAAS, M.J. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Jornaul of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, p. 113-148, 2009.

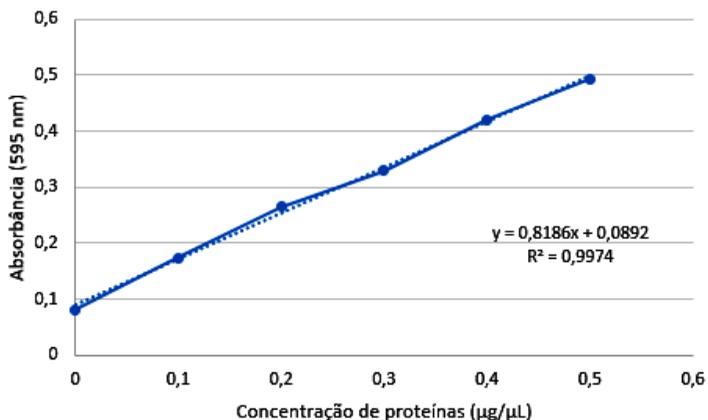
WARNER, J.C.; CANNON A.S.; DYE, K.M. Green Chemistry. **Environmental Impact Assesment Review**, New York, v.24, p.775-799, 2004.

XIAO, Q. et al. Characterization and immobilization of arylsulfatase on modifiedmagnetic nanoparticles for desulfation of agar. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 94, p.574-584, 2017.



## ANEXOS

ANEXO 1- Curva padrão de calibração para determinação de concentração de proteínas a partir do método de Bradford.



ANEXO 2 - Concentração de proteínas (em mg/mL) na solução enzimática durante a imobilização enzimática nos diferentes suportes de NPM-SDS.

Tempo (min)	Suporte 1 (1:1)	Suporte 2 (5:1)	Suporte 3 (10:1)	Suporte 4 (15:1)	Suporte 5 (20:1)
0	0,494	0,481	0,471	0,585	0,590
30	0,425	0,470	0,422	0,515	0,552
60	0,385	0,398	0,330	0,467	0,507
90	0,326	0,332	0,253	0,336	0,479
120	0,284	0,221	0,222	0,336	0,414
150	0,253	0,220	0,183	0,335	0,359
180	0,250	0,219	0,181	0,331	0,313

ANEXO 3 - Atividade hidrolítica (UL) do sobrenadante em função do tempo de imobilização.

<b>Tempo (min)</b>	<b>Suporte 1 (20:1)</b>	<b>Suporte 2 (1:1)</b>	<b>Suporte 3 (5:1)</b>	<b>Suporte 4 (10:1)</b>	<b>Suporte 5 (15:1)</b>
0	31,99	32,30	34,66	34,32	33,71
30	29,88	31,35	33,20	31,54	32,97
60	28,64	30,69	30,22	28,17	30,35
90	24,68	25,93	28,60	22,82	26,36
120	19,11	19,70	26,26	17,85	22,38
150	15,16	17,04	14,54	12,44	13,80
180	14,79	16,12	13,75	12,12	12,76

ANEXO 4 –Atividade hidrolítica enzimática do sobrenadante antes da imobilização e após (180 min) a imobilização.

<b>Suporte</b>	<b>Razão molar (Magnetita:SDS)</b>	<b>A<sub>h,o</sub> (UL)</b>	<b>A<sub>h,f</sub> (UL)</b>	<b>RI<sub>a</sub> (%)</b>
1	20:1	31,99	14,79	52,60
2	1:1	32,30	16,12	50,07
3	5:1	34,66	13,75	60,33
4	10:1	34,32	14,12	64,69
5	15:1	33,71	12,76	62,14

**A<sub>h,o</sub>** = Atividade hidrolítica inicial do sobrenadante (antes da imobilização);  
**A<sub>h,f</sub>** = atividade hidrolítica final do sobrenadante após 180 min de imobilização; **RI<sub>a</sub>** = rendimento teórico da imobilização com base na atividade enzimática.