

**SUPORTES MODIFICADOS COM PROPRIEDADES
SUPERPARAMAGNETICAS**

ELLENDE FREITAS BÔA MORTE

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE – UENF
CAMPOS DOS GOYTACAZES /RJ
MARÇO - 2017**

SUPORTES MODIFICADOS COM PROPRIEDADES SUPERPARAMAGNETICAS

ELLENE FREITAS BÔA MORTE

“Dissertação apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Materiais”.

Área de concentração: Polímeros e Compósitos
Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
MARÇO - 2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do **CCT / UENF**

49/2017

Bôa Morte, Ellen de Freitas
Suporte modificados com propriedades superparamagneticas / Ellen de Freitas
Bôa Morte. – Campos dos Goytacazes, 2017.
xii, 119 f. : il.
Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência dos Materiais) --
Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de
Ciência e Tecnologia. Laboratório de Materiais Avançados. Campos dos
Goytacazes, 2017.
Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodríguez.
Área de concentração: Polímeros e compósitos.
Bibliografia: f. 96-119.
1. SUPERPARAMAGNETISMO 2. SUPORTES ENZIMÁTICOS 3.
BIOCATALISADORES 4. NANOMAGNETITAS I. Universidade Estadual
do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Centro de Ciência e Tecnologia.
Laboratório de Materiais Avançados II. Título

CDD 620.118

SUPORTES MODIFICADOS COM PROPRIEDADES SUPERPARAMAGNETICAS

ELLEDE FREITAS BÔA MORTE

“Dissertação apresentado ao Centro de Ciência e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Materiais”.

Aprovado em março de 2017.

Comissão Examinadora:

Prof. Gustavo Wagner De Menezes (D.Sc., Eng. e Ciencia dos Materiais) –
IFF/NUPAC

Prof. Oselys Rodriguez Justo (D. Sc., Eng. Química) – UNESA

Prof. Teresa Eligio Castillo (D.Sc., Eng. e Ciencia dos Materiais) –
UENF/CCT/LAMAV

Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez (D.Sc., Ciências Químicas) –
UENF/CCT/LAMAV (Orientador)

“Dedico a Deus, que nos criou e foi criativo nessa tarefa. Seu fôlego de vida em mim me foi sustento e me deu coragem para questionar realidades e propor sempre um novo mundo de possibilidades. E aos meus pais por sua capacidade de acreditar e investir em mim.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, a Quem sempre clamei durante o trabalho, recorri nos momentos de sufoco e alegria. Pela constante presença em minha vida e por me dar forças para lutar pelos meus objetivos e ultrapassar as dificuldades.

Aos meus pais, Marcos e Edna, pelos valores repassados, pelo incansável apoio diário, estímulo no desânimo, conforto nas derrotas e parabéns pelas vitórias. Por terem me incentivado sempre nos estudos, pelo apoio financeiro e moral, sendo exemplos de dedicação, confiança, dignidade e amor.

Um agradecimento especial dedico aos meus familiares e grandes amigos pela paciência em tolerar a minha ausência, pelo estímulo e apoio, em especial a minha irmã Míria e à minha madrinha Rita por tamanha dedicação e aos demais padrinhos, primos, tios, e amigos queridos que torcem e oram por mim.

Ao meu orientador Doutor Rubén Sánchez Rodríguez pela competência científica e orientação dada, por ter me ensinado com prazer e dedicação, pela disponibilidade, paciência e compreensão demonstrados, assim como pelas críticas, correções e sugestões relevantes feitas durante a orientação.

Aos demais professores do Departamento de Pós Graduação em Engenharia e Ciências de Materiais e também ao corpo técnico, auxiliares, administração, coordenação e alunos que participaram dessa minha caminhada.

Aos colegas do Laboratório do Setor de Polímeros, que me auxiliaram na realização deste trabalho e proporcionaram um ambiente de trabalho tão acolhedor. Em especial a Letícia, Mayara, Mariana, Gabriel, Darlan e Professor Doutor Djalma Souza pela amizade, dicas e parcerias no trabalho e a Magno, Tcharllis, Murilo e Elaine pelo apoio e distração nos momentos necessários.

A Professora Doutora Elisa Maria B. Saitovitch do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) e sua aluna Professora Mariella Alzamora Camarena pela colaboração na realização e interpretação das análises de Espectroscopia de Mössbauer, Magnetometria de Amostras Vibrantes e Difração de Raio-X.

Ao Professor Doutor Flávio C. Miguens do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual do CBB/UENF e sua aluna Doutora Amanda Ferreira pela colaboração na realização das análises de MET e de MEV.

Ao professor Sérgio Neves, pela ajuda na realização do MEV-FEG na COPPE/UFRJ.

Ao Professor Doutor Victor Haber Perez do Laboratório de Tecnologia de Alimentos do CCTA/UENF pelo auxílio e liberação de equipamentos para experimentos e seu aluno Doutor Geraldo Ferreira David pelo apoio.

A CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro, na realização deste trabalho.

À UENF pela estrutura Física e oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

“Não deixe que a saudade sufoque, que a rotina acomode, que o medo impeça de tentar. Desconfie do destino e acredite em você. Gaste mais horas realizando que sonhando, fazendo que planejando, vivendo que esperando, porque, embora quem quase morre esteja vivo, quem quase vive já morreu.”

(Luis Fernando Verissimo)

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
INDÍCIE DE FIGURAS	iii
INDÍCIE DE TABELAS.....	v
INDÍCIE DE EQUAÇÃO.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	vii
RESUMO	ix
ABSTRACT.....	xi
1– INTRODUÇÃO.....	1
1.1 – OBJETIVO GERAL	3
1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
1.3 – JUSTIFICATIVAS.....	3
2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
2.1 – BIOCATALISADORES	5
2.1.1 – Imobilizações de Enzimas.....	10
2.1.2 – Reatores Enzimáticos.....	16
2.1.3 – Nanomateriais Magnéticos	19
2.1.4 – Suportes para imobilização.....	26
2.2 – Produção De Biodiesel Com Biocatalisadores.....	38
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 – Materiais	42
3.2 – Preparação e Caracterização dos Suportes.....	43
3.2.1 – Formulação de Nano Magnetitas	43
3.2.2 – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das NPM	45
3.2.3 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das NPM	45
3.2.4 – Caracterização por Difração de Raios-X das NPM	46
3.2.5 – Espectroscopia Mössbauer dos NPM	46
3.2.6 - Formulação das Microesferas Magnéticas de Quitosana	47

3.2.7-	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Microesferas	48
3.2.8–	Magnetometria de Amostra Vibrantes (VSM)	48
3.2.9 -	Análise Térmica (TG) dos Suportes Modificados.	49
3.3 –	Imobilização das enzimas, através da técnica de ligação covalente	49
3.3.1 –	Ativação Com Glutaraldeído das Microesferas M-AO-Q	49
3.3.2 –	Ativação com Glutaraldeído da M-APTS	49
3.3.3 –	Avaliação da Ativação com Glutaraldeído por FTIR	50
3.3.4 -	Determinação de Proteína	50
3.3.4 –	Imobilização da Lipase nas M-AO-Q-GA e M-APTS-GA	51
3.3.5 –	Determinação da Atividade Relativa	52
4 –	RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
4.1 –	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	54
4.2 -	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR) dos Suportes Modificados	59
4.3 –	Caracterização por Difração de Raio-X.....	60
4.4 –	Determinação das Fases de Ferro por Espectroscopia Mössbauer	62
4.5 -	Análise Térmica (TG) dos Suportes Modificados	65
4.6 –	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Microesferas	66
4.7 –	Magnetometria de Amostra Vibrantes (VSM).....	68
4.8 -	Avaliação da Ativação com Glutaraldeído por FTIR	70
4.9 –	Determinação de Proteína.....	73
4.10 –	Determinação da Atividade Relativa.....	74
5 –	CONCLUSÕES	75
6 –	REFERÊNCIAS	76

INDÍCIE DE FIGURAS

FIGURA 1 - COMPARAÇÃO ENTRE CATÁLISE BÁSICA E ENZIMÁTICA (SRIVATHSAN ET AL 2008).	6
FIGURA 2 – MÉTODOS PARA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS (FISCHER, 2010).	12
FIGURA 3 – ILUSTRAÇÃO DA TÉCNICA DE ADSORÇÃO FÍSICA E LIGAÇÃO COVALENTE PARA A IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS (ADAPTADO DE BICKERSTAFF, 1997).	13
FIGURA 4 – REPRESENTAÇÃO DOS PRINCIPAIS MODELOS DE REATORES (POPPE ET AL., 2015 MODIFICADO).	16
FIGURA 5 – DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DE UM MSFBR. 1) BOBINAS DE FIO DE COBRE, 2) COLUNA DE VIBRO PREENCHIDA COM OS SUPORTES MAGNÉTICOS IMOBILIZADOS, 3) REVESTIMENTO DE AQUECIMENTO, 4) BOMBA PERISTÁLTICA, 5) RESERVATÓRIO, 6) AGITADOR MAGNÉTICO E 7) VÁLVULA DE SEGURANÇA (ZHOU ET AL., 2014).	18
FIGURA 6 - CURVAS DE HISTERESE CARACTERÍSTICAS DE NPs FERROMAGNÉTICAS, DIAMAGNÉTICAS, PARAMAGNÉTICAS E SUPERPARAMAGNÉTICAS E VALORES DE REMANESCÊNCIA, MR, E CAMPO COERCIVO, HC (ARRUEBO ET AL., 2002).	20
FIGURA 7 – POLIEDRO DE FERRO NA CÉLULA UNITÁRIA DE MAGNETITA (AZUL É OCUPADO POR Fe ³⁺⁺ , VERDE É OCUPADO POR Fe ²⁺ , Fe ³⁺ E OXIGÊNIO EM VERMELHO) (REBELO, 2009).	22
FIGURA 8 – INTERAÇÃO ENTRE O GRUPO COOH- DE ÁCIDO OLEICO E O ÁTOMO DE FERRO, FORMANDO UM IMPEDIMENTO ESTÉRICO (MAHMOUDI ET AL., 2011).	25
FIGURA 9 - SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS COM APTS INTRODUZINDO GRUPOS AMINAS (ROCHA 2016).	26
FIGURA 10 – ILUSTRAÇÃO ESQUEMÁTICA DA IMOBILIZAÇÃO COVALENTE DA ENZIMA EM MICROESFERAS DE QUITOSANA ATIVADAS COM GLUTARALDEÍDO (HUANG ET AL., 2005).	30
FIGURA 11 – 1) GLUTARALDEÍDO FOI LIGADA À NANOPARTÍCULAS FUNCIONALIZADA COM APTS; 2) LIPASE FOI IMOBILIZADO SOBRE A PARTÍCULA ATIVADA POR LIGAÇÃO COVALENTE (ROCHA, 2016).	31
FIGURA 12 - ESTRUTURA MOLECULAR DO GLUTARALDEÍDO (MONTEIRO-JUNIOR E AIROLDI, 1999).	34
FIGURA 13 - ESTRUTURA QUÍMICA DA QUITINA, QUITOSANA E CELULOSE (ABAZINGE ET AL., 1993).	36

FIGURA 14 - ESQUEMA RESUMIDA DA REAÇÃO DE PRODUÇÃO DE BIODIESEL (COSTA ET AL., 2000).....	39
FIGURA 15 – REATOR IKA-250 LOCALIZADO NO SETOR DE POLÍMEROS LAMAV	44
FIGURA 16 – ESQUEMA PARA GOTEJAMENTO DE MICROPARTÍCULAS DE M-AO-Q.....	47
FIGURA 17 - MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DE DIFERENTES REGIÕES DAS NANOMAGNETITAS MODIFICADAS COM ÁCIDO OLEICO PELO MÉTODO DE GNANAPRAKASH ET AL., 2007 (A) E (B) E PELO MÉTODO DE ROCHA, 2016 (C) E (D).....	55
FIGURA 18- MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO EM DIFERENTES REGIÕES DAS NANOMAGNETITAS MODIFICADAS COM APTS PELO MÉTODO DE GNANANPRAKASH ET AL., 2007 (A) E (B) E PELO MÉTODO DE ROCHA, 2016 (C) E (D).	56
FIGURA 19- MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS NANOMAGNETITAS MODIFICADAS COM AO (A) E COM APTS EM (B) PELO MÉTODO DE GNANANPRAKASH.	57
FIGURA 20 - GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DAS NP, M-AO E M-APTS.....	58
FIGURA 21 - ESPECTROS DE FTIV DAS M-AO E M-APTS.	59
FIGURA 22 - DIFRATOGRAMA DE RAIO-X DA AMOSTRA M-APTS EM (A) E M-AO EM (C), E A FICHA PADRÃO DE MAGNETITA E MAGHEMITA, JCPDS 19-0629, EM (B).	61
FIGURA 23 - ESPECTRO MÖSSBAUER DAS AMOSTRAS M-AO E M-APTS.....	63
FIGURA 24 - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DOS SUPORTES M-APTS.....	65
FIGURA 25 - CURVAS TERMOGRAVIMÉTRICAS DOS SUPORTES M-AO-Q.....	66
FIGURA 26 – MICROGRAFIA ELETRÔNICA DE VARREDURA DAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS EM (A, B E C) E A PAREDE DA MICROESFERA (D).	67
FIGURA 27- GRÁFICO DA DISTRIBUIÇÃO DAS MICROESFERAS MAGNÉTICAS.	68
FIGURA 28 - CURVA DE MAGNETIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE M-AO.....	69
FIGURA 29 - CURVA DE MAGNETIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE M-APTS.	69
FIGURA 30 - ESPECTROS DE FTIV DOS M-APTS, M-ATPS-GA E M-ATPS-GA-LIPASE. 71	
FIGURA 31 - ESPECTROS DE FTIV DOS M-AO-Q, M-AO-Q-GA E M-AO-Q-GA-LIPASE. 72	

INDÍCE DE TABELAS

TABELA 1 - PRODUÇÃO BIODIESEL CATALISADA POR ENZIMAS COMERCIAIS E CÉLULAS LIVRES	8
TABELA 2 – CLASSIFICAÇÃO DOS SUPORTES DE ACORDO COM A COMPOSIÇÃO (GALVÃO, 2004).....	29
TABELA 3 - PARÂMETROS OBTIDOS NO ESPECTRO DE MÖSSBAUER	64
TABELA 4 – CONCENTRAÇÕES RELATIVAS DE SOLUÇÕES ENZIMÁTICAS.....	73
TABELA 5 - VALORES DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA DOS SUPORTES IMOBILIZADOS.....	74

INDÍCE DE EQUAÇÃO

SÍNTESE DE MAGNETITA Eq.1.....	23
CONCENTRAÇÃO DE IMOBILIZADO Eq. 2.....	51
ATIVIDADE HIDROLÍTICA Eq. 3.....	53
ATIVIDADE RELATICA Eq. 4.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AO – Ácido Oleico

APTS - 3-Aminopropiltriétoxissilano

BSA - Albumina de Soro Bovino

C=O - Carbonila

CaCO₃ – Carbonato de Cálcio

CBB – Centro de Biociências e Biotecnologia

CBPF – Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas

CCT – Centro de Ciências e Tecnologia

CCTA – Centro de Ciências e Tecnologia Agrária

CH₂ – Metileno

CO₂ – Dióxido de Carbono

COOH- -Grupo Carboxílico

DRX – Difração de Raio-X

Fe₃O₄ – Magnetita

FeCl₃.5H₂O - Cloreto ferrico III (ICO) hexahidratado

Fe-O – Óxido de Ferro

FeSO₄.7H₂O - Sulfato ferroso II (OSO) heptahidratado

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

GA – Glutaraldeído

Hc - Campo Coercivo

HCl – Ácido Clorídrico

KBr – Brometo de Potássio

KOH – Hidróxido de Potássio

LAMAV – Laboratório de Materiais Avançados

LDRX - Laboratório de Difração de Raios X

M-AO - Nanopartículas Magnéticas Modificadas com Ácido Oleico

M-AO-Q – Microcapsula de quitosana com Nanopartículas Magnéticas Modificadas com Ácido Oleico

M-AO-Q-GA - Microcapsula de quitosana com Nanopartículas Magnéticas Modificadas com Ácido Oleico e ativadas com Glutaraldeído

M-AO-Q-GA-Lipase - Microcapsula de quitosana com Nanopartículas Magnéticas Modificadas com Ácido Oleico, ativada com Glutaraldeído e com Lipase AK imobilizada covalentemente

M-APTS - Nanopartículas Magnéticas Modificadas com 3-aminopropiltriétoxissilano

M-APTS-GA - Nanopartículas Magnéticas Modificadas com 3-aminopropiltriétoxissilano e ativadas com Glutaraldeído

M-APTS-GA-Lipase - Nanopartículas Magnéticas Modificadas com 3-aminopropiltriétoxissilano, ativadas com Glutaraldeído e com Lipase AK imobilizada covalentemente

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

M_r - Magnetização de Saturação

MSFBR - Reator de Leito Fluidizado Estabilizado Magneticamente

N_2 - Nitrogênio

NaOH - Hidróxido de sódio

-NH - Grupo Amina

NH_2 - Amina primária

nm - Nanômetros

NP - Nanopartículas

NPM - Nanopartículas Magnéticas

-OH - Grupo Hidroxila

PEG - Polietilenoglicol

RNA - Ácido Ribonucleico

SEPOL - Setor de Polímeros

-SH - Grupo Tio

TGA - Análise termogravimétrica

UENF - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy ribeiro

UFF - Universidade Federal Fluminense

VSM - Magnetometria de Amostra Vibrantes

μL - microlitros

RESUMO

O avanço no estudo de suportes para a imobilização enzimática indica a necessidade de desenvolvimento de suportes mais efetivos, centralizando a atenção nas características estruturais e superficiais do suporte e nas condições de imobilização da enzima.

Este trabalho esteve direcionado ao desenvolvimento e caracterização de dois diferentes tipos de suportes magnéticos para a obtenção de lipases imobilizadas com aplicação na síntese de biodiesel. Neste intuito, foram investigadas técnicas diferentes de co-precipitação de sais de ferro seguido por duas diferentes formas de modificação de sua superfície. As modificações foram acompanhadas utilizando a técnica de espectrometria de infravermelho (FTIR).

Nanomagnetita estabilizadas com ácido oleico ou modificadas com 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS) foram sintetizadas pelo método de co-precipitação de sais de ferro II e III em meio básico, com o primeiro sendo em encapsulado com quitosana. As nanopartículas foram caracterizadas com o auxílio da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Magnetometria de Amostra Vibrantes (VSM), Espectroscopia de Mössbauer assim como a técnicas de difração de raios-x e Termogravimetria (TGA).

Foi realizada uma imobilização de forma covalente da Lipase comercial obtida a partir da "*Pseudomonas fluorescens*" (Lípase AK) nas micropartículas, sendo previamente ativadas. A ativação com glutaraldeído foi investigada por FTIR e ensaios de atividade utilizando uma emulsão de azeite de oliva foram realizados para avaliação da atividade catalítica da Lipase.

A síntese da nanomagnetita originou um material com uma alta cristalinidade e com tamanho médio do cristalito de 12 nm para as partículas modificadas com ácido oleico e 10 nm para as modificadas com APTS, com análise de Mössbauer confirmando que as partículas são de magnetita. As micrografias do MET confirmaram nanopartículas com distribuição de tamanho de 2,5 a 32,5 nm e baixa agregação.

As propriedades magnéticas apresentadas são favoráveis para o uso em reatores de leito fluidizado assistido magneticamente, possibilitando o controle dentro do reator e a distribuição das partículas magnéticas assim como as

possibilidades de operar no reator com fluxos maiores e a fácil recuperação do biocatalisador.

Ensaio de atividade avaliaram uma boa atividade relativa nos derivados enzimáticos e podem ser utilizados como biocatalisadores em processos de transesterificação enzimática em reatores assistidos por campo eletromagnético.

Palavras-chaves: Superparamagnetismo, Suportes Enzimáticos, Biocatalisadores e Nanomagnetitas.

ABSTRACT

The development at support study for enzymatic immobilization indicates the need of advancing of more effective supports, consolidating the attention in their structural and superficial characteristics and conditions of enzyme immobilization.

This project is conducted to development and characterization of two different types of magnetic support for obtaining immobilized lipases with application at synthesis of biodiesel. For this purpose, different techniques of iron salt will be investigated followed by two different forms of surface modification. The modifications were succeed utilizing Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).

Both nano magnetite stablyzed with oleic acid and modified with 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) were syntesized with coprecipitation method of II and III salt iron in basic environment, the first was encapsulated with chitosan. The methods used to characterized the nanoparticles were Scanning Electron Microscopy (SEM), Vibrating Sample Magnometer (VSM), Mössbauer Spectroscopy, Thermogravimetric analysis (TGA) and X-ray diffraction (XRD).

A covalent immobilization of commercial Lipase was obtained from *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK) in microparticles, being previosly activated, the ativations were succeed utilizing FTIR. Activated experiments utilizing emulsion olive oil were realized for avaliation of Lipase catalitic activity.

The syntesis of nanomagnetite originates a material with high cristalinity and medium crystallite size of 12 nm for modified particles with oleic acid and 10 nm for APTES, according to Mössbauer analysis certifiyng that particles are magnetite. The TEM micrografies showed that nanoparticles present size distribution of 2 to 35 nm and low aggregation.

The magnetic properties of the nanoparticles are favorable for use in fluidized-bed reactor, facilitating the control inside the reactor and the distribution of magnetic particles as much as the possibility to operate in reactors with large flows and the easy biocatalyst recuperation.

The activity experiments evaluated a good relative activity in the enzymatic derivative and they can be used as biocatalysts in enzymatic trans esterification in reactors assisted by electric field.

Keywords: Superparamagnetism, Enzyme Supports, Biocatalysts and Nano magnetite

1- INTRODUÇÃO

O empenho de diferentes setores para criar alternativas à atual matriz energética, é devido a cobrança de práticas de políticas de proteção ambiental com redução do uso de recursos não renováveis (Duarte et al., 2006). Biocombustíveis apresentam benefícios, como, sustentabilidade, redução dos gases estufa, desenvolvimento regional e agrícola (Demirbas, 2007). Pesquisas no Brasil visam à produção do biodiesel sob três pilares: ambiental, social e técnico-econômico, como parte de políticas energéticas ou de mudanças climáticas (Rathmann et al., 2012).

O uso de biocatalisadores na indústria é amplamente estudado, pelo fato de ter alta atividade catalítica em comparação com os catalisadores químicos, convencionalmente utilizados, e por possuírem alta eficiência em condições reacionais brandas (Dalla-Vecchia et al., 2004). A imobilização de enzimas é uma opção atraente por três principais motivos: reutilização do biocatalisador; possibilidade de processo contínuo; e aumento da estabilidade em relação às variações de pH, temperatura, solventes e concentração de substratos (Dalla-Vecchia et al., 2004).

A imobilização em materiais magnéticos é um método simples e efetivo. A recuperação fácil do imobilizado pode ser feita com a aplicação de um campo magnético externo e a elevada área superficial desses materiais permite a imobilização de uma grande quantidade de enzima por unidade de superfície (Kuo et al., 2012).

O estudo dos métodos de produção de estruturas nanométricas tem tido grande ênfase devido a necessidade de conhecimento e modificação de suas propriedades físico-químicas, que não aparecem normalmente em estruturas de dimensões micrométricas (Leslie-Pelecky e Rieke, 1996). Com o revestimento apropriado, as nanopartículas magnéticas (NPM) não sofrem aglomeração, permitindo sua aplicação sem a presença de agregados. Além disso, o revestimento pode possuir grupos funcionais em sua superfície que reagem com a superfície da enzima. Revestimento com materiais poliméricos ganhou

destaque, por garantir maior estabilidade às NPMs e garantir seu comportamento superparamagnético (Landfester e Weiss, 2010).

Neste contexto, este trabalho teve como meta a obtenção de lipases imobilizadas em dois diferentes tipos de suportes magnéticos para aplicação na síntese de biodiesel. Neste intuito, foram investigadas técnicas diferentes de co-precipitação de sais de ferro seguido por duas diferentes formas de modificação de sua superfície, com uma das NPM modificadas recebendo ainda um revestimento polimérico. O trabalho foi direcionado para o aprimoramento dos procedimentos de suportes magnéticos visando à obtenção de biocatalisadores imobilizados ativos na condução de reações de biotransformação reversíveis, como a produção de biodiesel em reatores de leito fluidizado associado com um campo magnético externo.

1.1 – OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo, a formulação e caracterização de suportes a partir de nanopartículas superparamagnéticas modificadas visando sua aplicação em processos assistidos por um campo magnético externo.

1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Síntese e caracterização de nanomagnetitas (Fe_3O_4) para utilização como nanopartículas magnéticas na formulação de biocatalisadores.
- Formulação e caracterização de suportes com propriedades magnéticas.
- Funcionalização da superfície de nanomagnetita (Fe_3O_4), para a imobilização direta de enzimas.
- Imobilização da Lipase nos suportes desenvolvidos e avaliação da atividade hidrolítica da mesma.
- Avaliação da interferência na imobilização e na atividade enzimática da superfície do polímero utilizado como suporte.

1.3 – JUSTIFICATIVAS

A Universidade tem os grupos de pesquisas “Polímeros a partir de Recursos Renováveis” (CCT) e “Biomagnetismo Aplicado à Engenharia de Processos da Indústria de Alimentos”, (CCTA) que em colaboração com o grupo do Prof. Elisa Saitovich (CBPF) abordam de forma multidisciplinar o desenvolvimento e caracterização de biocatalisadores assim como o estabelecimento de condições favoráveis para a produção de biodiesel como uma fonte de energia ambientalmente favorável.

A imobilização de enzimas é um dos caminhos mais atrativos para cortar gastos nos processos enzimáticos industriais. Entre outros fatores, as características morfológicas, físico-químicas e de superfície do suporte, determinam as propriedades das enzimas imobilizadas. É de grande interesse o

estudo de suportes magnéticos para aplicações em bioprocessos e em muitas aplicações biotecnológicas é necessário o recobrimento e ou modificação da superfície das nanopartículas magnéticas para obtenção de estabilidade química e mecânica, evitando, assim, oxidação e aglomeração, além de introduzir funcionalidades na superfície do material modificando sua especificidade de ligação.

A maioria dos suportes magnéticos disponíveis comercialmente foram formulados para aplicações em biomedicina e diagnósticos (Franzereb *et al.*, 2006). Assim, as características de tais materiais magnéticos não são ótimas para aplicação em bioprocessos em escala industrial. Logo, é necessário o desenvolvimento de novos suportes magnéticos com características como alta capacidade de carga, com baixo custo de produção e que possam ser ativados com diferentes grupos funcionais visando diferentes aplicações.

Com isso, fica evidente a necessidade de aprofundamento em investigação da síntese de suportes magnéticos com características ótimas para aplicações em bioprocessos, sobretudo na imobilização de enzimas.

A funcionalização da superfície com introdução de grupos necessários para a imobilização de enzimas permitirá um comparativo aos resultados das microesferas poliméricas com magnetitas e com isso avaliar a interferência que o polímero pode ter na imobilização e posterior comportamento de tais enzimas imobilizadas.

2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

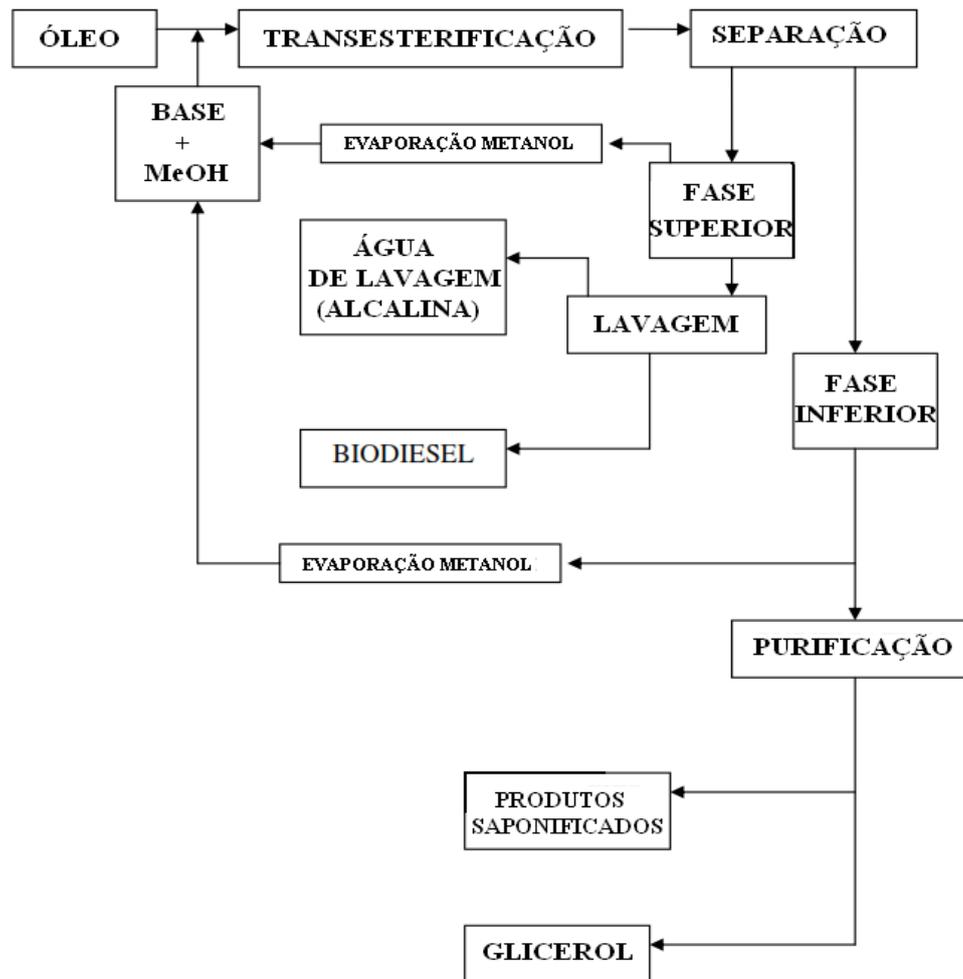
2.1 – BIOCATALISADORES

Com exclusão de um pequeno grupo de moléculas catalíticas de RNA (ácido ribonucleico), todas as enzimas são proteínas (Galvão, 2004). Quase totalidade das enzimas são definidas como proteínas globulares formadas por resíduos de aminoácidos unidos por ligações peptídicas (Gürsel *et al.*, 2003; Isik *et al.*, 2003). São biocatalisadores existentes em sistemas biológicos e em organismos vivos, acelerando e/ou possibilitam a ocorrência de uma reação sem serem consumidas (Souza, 2006; Simões *et al.*, 2011; Santos, 2012).

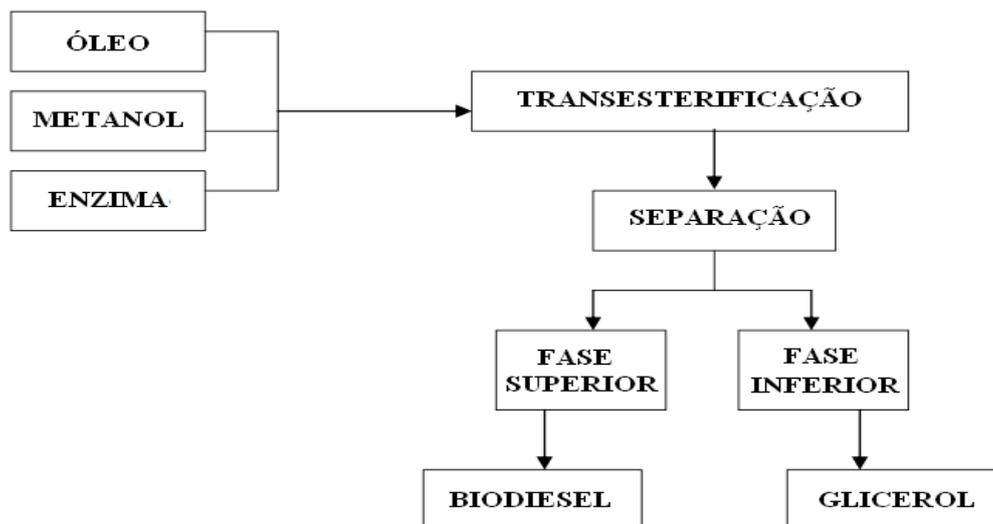
Enzimas podem ser de origem animal (pancreatina, tripsina, quimiotripsina, pepsina, renina, catalase) vegetal (papaína, bromelina, ficina), e microbiana (celulases, amilases fúngicas, lipases), essas últimas são obtidas por meio de bactérias, fungos filamentosos e leveduras (Araújo, 2009; Santos, 2012). O interesse industrial é maior pelas enzimas microbianas, já que estas são produzidas mais facilmente em larga escala (Santos, 2012).

As enzimas possuem uma grande versatilidade em catálise de reações de vários tipos, que acontecem sob condições brandas, frequentemente à pH próximo ao neutro e temperatura ambiente. A velocidade da reação com catalise enzimática pode ser até 10^{12} vezes maior do que as não catalisadas. Reações colaterais que levam ao desperdício de formação de produtos secundários raramente ocorrem (Nelson *et al.*, 2000).

Os biocatalizadores exibem benefícios importantes sobre os catalisadores clássicos, como a regioseletividade (distinguir entre grupos funcionais com a mudança de região), a enantioseletividade (são catalisadores quirais e sua especificidade pode ser explorada para sínteses seletivas e assimétricas) e a quimioseletividade (atuam em somente um tipo de grupo funcional mesmo na presença de outros grupos reativos), resultando em uma catálise de reações com condições brandas de temperatura e pressão, com um número reduzido de subprodutos e com baixo custo no tratamento de resíduos (Facioli *et al.*, 1998).



(a) Catálise básica



(b) Catálise enzimática

Figura 1 - Comparação entre catálise básica e enzimática (Srivathsan *et al* 2008).

Em 1997, a produção enzimática de biodiesel foi patenteada por Haas (Haas, 1997), o processo ainda não foi implementado devido às restrições, como o alto custo das enzimas, a perda da atividade enzimática e a inibição das enzimas por metanol. Vários artigos têm citado caminhos alternativos para tais empecilhos, objetivando a implementação industrial da produção enzimática de biodiesel. (Ranganathan *et al.*, 2008).

Srivathsan e colaboradores (2008) apresentaram um fluxograma comparando as etapas do processo de catálise básica e o processo com biocatalisadores (enzimas), representado pela Figura 1.

Moreira (2003) menciona em seu trabalho que para uso na bioconversão de lipídeos em biocombustíveis as enzimas mais vantajosas são as hidrolíticas. Das enzimas hidrolíticas, as lipases têm um destaque maior em pesquisas, por serem de fácil obtenção, baixo custo, promoverem uma catálise mais simples produzindo um produto mais puro.

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases) são enzimas que catalisam em meio aquoso a hidrólise de óleos e gorduras com liberação de ácidos gordos, monoacilgliceróis, diacilgliceróis, e glicerol (Villeneuve *et al.*, 2000). A função natural das lipases é a hidrólise de triglicerídeos, mas elas podem ser usadas *in vitro* para catalisar muitas reações diferentes. Industrialmente, são usadas na modificação de óleos e gorduras, síntese de ácidos graxos como cosméticos ou surfactantes, e para produzir muitos intermediários diferentes para síntese orgânica (por exemplo: na resolução de misturas racêmicas) (Palomo *et al.*, 2002).

Do ponto de vista industrial, as lipases são consideradas muito importantes devido às suas propriedades catalíticas e fácil produção em escala ampliada (Klaas *et al.*, 2002; Nagayana *et al.*, 2002; Solymár *et al.*, 2002; Shimada *et al.*, 2002; Fomuso e Akon, 2002). Entre as várias razões que as tornam uma opção particularmente atrativa, pode-se citar ampla disponibilidade, baixo custo, condições suaves de síntese, facilidade de uso porque não necessitam de co-fatores e ampla especificidade para substratos. O uso desses catalisadores é crescente em escala industrial, especialmente na indústria

farmacêutica, de detergentes, couros e panificação, entre outras (Dalla-Vecchia et al., 2004).

Graças ao alto poder de catálise, a aplicação de lipases cresceu nas últimas décadas, sendo utilizadas em vários segmentos biotecnológicos, como na indústria agroquímica (inseticidas e pesticidas), de alimentos (desenvolvimento de aromas e maturação de queijos), de detergentes, farmacológicas (síntese de naxopreno e ibuprofeno), e oleoquímica (hidrólise de óleos e gorduras, síntese de biosurfactantes) (Krieger *et al.*, 1999).

Muitos trabalhos foram publicados na literatura sobre o uso de enzimas e células livres para a produção de biodiesel. Na grande maioria, enzimas comerciais foram usadas. Na tabela 1 estão mostrados alguns resultados.

Tabela 1 - Produção biodiesel catalisada por enzimas comerciais e células livres

Enzima (E); Célula livre (CL)	Óleo ou Gordura Animal	Álcool	Temperatura e Velocidade	Rendimento (%)	Referência
Candida antarctica (E)	Soja	EtOH	32°C e 130 rpm	84,1	(ROSSET et al., 2011)
Rhizopus oryzae (CL)	Canola	MeOH	t.a. e 250 rpm	73,9	(JIN et al., 2009)
Rhizopus oryzae (CL)	Óleo usado	MeOH	t.a. e 250 rpm	57,2	(JIN et al., 2009)
Porcine pancreas (E)	Babaçu	n butanol	45°C e 150 rpm	95	(PAULA et al., 2007)
Pseudomona cepacia (E)	Girassol	n butanol	40°C e 150 rpm	88,4	(DENG et al., 2005)
Rhizomucor miehi (E)	Girassol	MeOH	40°C e 200 rpm	80	(SOUMAN OU e BORNSCH EUER, 2001)
Pseudomona fluorescens (E)	Soja	MeOH	35°C e 150 rpm	90	(KAIEDA et al., 2001)

A especificidade ao substrato é uma característica importante, sendo um fator decisivo para a produção de biodiesel. As lipases de *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas cepacia*, *Candida rugosa*, *Candida antarctica* e *Candida cylindracea* são adequadas para a reação de transesterificação, exibindo tanto a especificidade do substrato quanto de regioespecificidade (Szczesna-Antczak et al., 2009).

Apesar das lipases das diferentes fontes serem capazes de catalisar a transesterificação para a produção de biodiesel, as lipases obtidas de bactérias e fungos, tais como *Aspergillus niger*, *Candida antarctica*, *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Mucor miehei*, *Pseudomonas cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Photobacterium lipolyticum*, *Rhizopus oryzae*, *Streptomyces sp.* e *T. lanuginosus* são mais usadas nesta reação (Ranganathan et al., 2008; Bajaj et al., 2010).

O setor de biotecnologia tem alcançado um grande progresso em estudos com o desenvolvimento de novos biocatalizadores, com o aprimoramento de novos métodos que utilizam enzimas imobilizadas em suportes diversos, tendo em vista a melhora da área de superfície dos biocatalizadores, sua resistência na transferência de massa e a carga eficaz da enzima (Marum, 2013).

Moreira e seus colaboradores (2007) apresentaram um estudo da atividade de transesterificação do óleo de palma com seis lipases diferentes (lipolase, AK, PS, G, L CALB e PPL), sendo os suportes previamente ativado com glutaraldeído. A lipase AK (*Pseudomonas fluorescens*) foi o biocatalizador mais apropriado para realizar a síntese de transesterificação do biodiesel com rendimentos de 91%. Tal lipase quando imobilizada apresentou-se mais ativa e estável do que em sua forma livre. O produto purificado (biodiesel) teve valores de viscosidade muito próximos do diesel comercial. O processo de transesterificação enzimática com este biocatalizador foi considerado uma alternativa atraente para a catálise química convencional.

2.1.1 – Imobilizações de Enzimas

As enzimas sofrem inativação por fatores biológicos, físicos e/ou químicos, estocadas ou durante o uso. Logo, é necessário resguardá-la da interação com o meio reacional, para garantir uma catálise eficiente. Técnicas de imobilização são desenvolvidas para viabilizar estabilidade as enzimas, facilitar a recuperação e possibilitar a reutilização (Villeneuve *et al.*, 2000).

Imobilização de enzimas é o confinamento físico de enzimas numa certa região definida, com retenção de sua atividade catalítica, tornando possível a utilização repetida e contínua de tais enzimas (Comerlato, 1995). Assim, as enzimas imobilizadas estão em um espaço, separadas por barreiras que permitem o contato entre a enzima e o substrato no meio de reação, mas que as tornam pouco solúveis em qualquer meio.

O primeiro trabalho sobre imobilização de enzimas data do início do século XX, quando Nelson e Griffin (1916) adsorveram invertase em carvão ativado e alumina, com retenção de atividade na inversão de sacarose. As pesquisas na área de imobilização intensificaram-se a partir dos anos 60, no sentido de estabelecer métodos eficientes de imobilização (Vitolo, 2001).

Destaca-se como pontos desejáveis em um processo de imobilização para um biocatalisador industrial adequado (Garcia-Galan *et al.*, 2011):

- i. Estabilização da enzima;
- ii. Impacto da imobilização na atividade da enzima;
- iii. Redução dos problemas de inibição;
- iv. Resistência mecânica;
- v. Simplicidade do protocolo de imobilização.

Há dois tipos de leito para a imobilização de enzimas e células, os que as aderem à superfície com as células fixadas ao suporte diretamente por ligações químicas (iônicas ou covalentes) e os que as aprisionam fisicamente, onde são encapsuladas em fibras ou glóbulos feitos de polissacarídeos, de proteínas ou de polímeros sintéticos (Meersman, 1992).

A interação entre a enzima e o material do suporte influencia as características do derivado imobilizado, determinando suas propriedades

bioquímicas, cinética, mecânicas e químicas (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). As vantagens básicas das enzimas imobilizadas em relação as solúveis podem ser enumeradas como (Bergamasco *et al.*, 2000; Gürsel *et al.*, 2003; Gómez *et al.*, 2005; Szymanska *et al.*, 2007):

- i. Podem ser usadas por um maior período de tempo, levando a redução do uso de enzima,
- ii. Processos com enzimas imobilizadas podem ser conduzidos preferencialmente de modo contínuo por ser facilmente controladas;
- iii. Possibilita o uso de uma maior dosagem de enzima por volume de reator;
- iv. Os produtos são facilmente separados do meio reacional;
- v. A estabilidade e, em alguns casos, a atividade das enzimas são aumentadas;
- vi. Permite a redução do capital operacional já que a vida útil de uma enzima imobilizada é suficientemente longa.

As interações entre a enzima e o suporte, no processo de imobilização, podem levar a modificações na configuração enzimática final e produzir diferentes efeitos sobre a atividade catalítica. Tendem a produzir efeitos negativos, como, distorções no centro ativo; inacessibilidade ao sítio ativo e problemas de difusão. Porém, podem manter formas superativadas da enzima ou ainda promover propriedades catalíticas totalmente alteradas e até melhores que suas formas solúveis (Mateo *et al.*, 2007).

2.1.1.1 – Imobilização por Ligação Covalente

Vários métodos de imobilização têm sido apresentados e empregados para contornar as possíveis dificuldades de instabilidade e otimizar as diversas aplicações (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004). A Figura 2 mostra, esquematicamente, os métodos empregados para imobilização de enzimas:

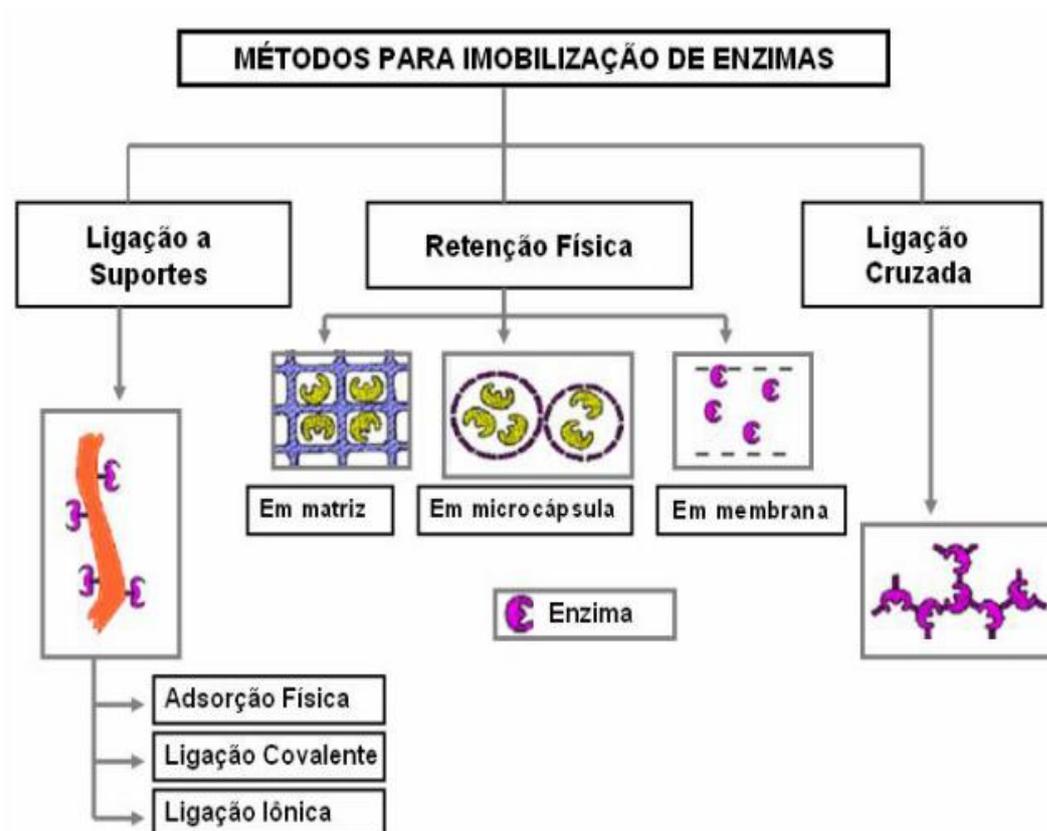


Figura 2 – Métodos para imobilização de enzimas (Fischer, 2010).

No método de ligação covalente grupos químicos constituintes da enzima interagem com grupos químicos do suporte ou do agente bifuncional ligados ao suporte. Os grupos da enzima que usualmente se ligam ao suporte são $-SH$, $-OH$, $-NH_2$, e a interação destes grupos com o suporte depende da reatividade, estado de protonação dos mesmos e da natureza dos grupos ativos do suporte (Vaidya *et al*, 2008).

A ligação covalente ilustrada na Figura 3, costuma envolver a modificação superficial do suporte com agentes bifuncionais para imobilização eficiente e irreversível da enzima, porém por envolver tratamento químico do suporte, pode ocorrer modificação no sítio ativo da enzima. Este método é considerado uma alternativa à fraca ligação proporcionada pelos métodos de adsorção física, o mais usado normalmente por aparentemente ser o mais simples de executar (Zhou e Hartmann 2013; Talbert e Goddard ,2012).

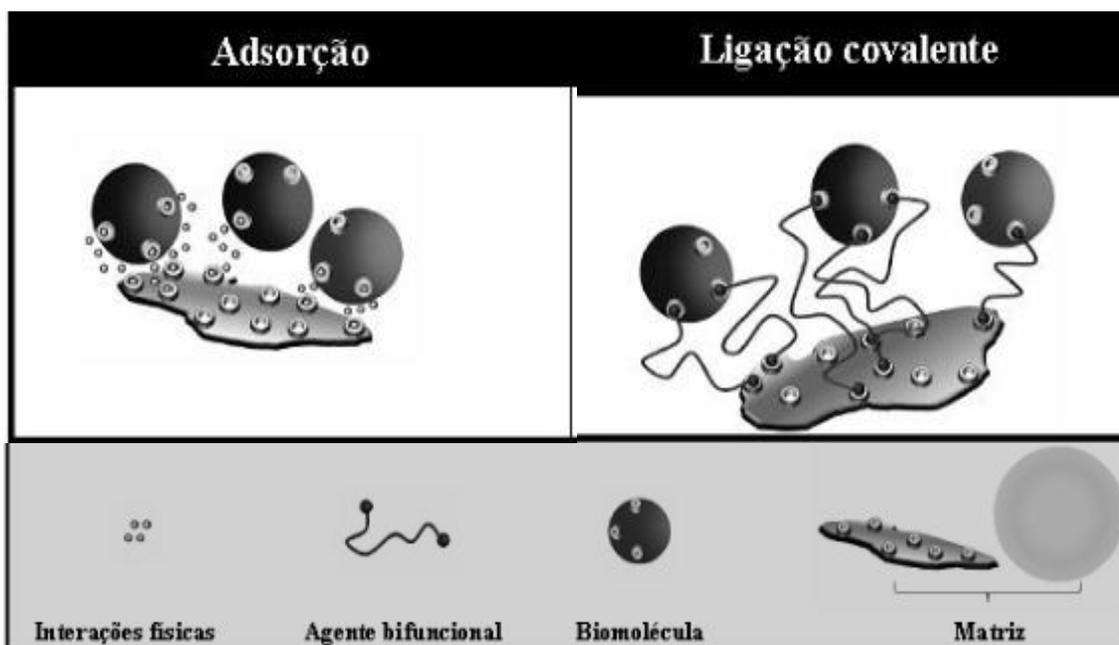


Figura 3 – Ilustração da técnica de adsorção física e ligação covalente para a imobilização de enzimas (Adaptado de Bickerstaff, 1997).

Mendes e seus colaboradores (2011) ressaltaram que os biocatalizadores preparados por ligação covalente podem ser utilizados em diversas conformações de reatores, como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado, com a carga da enzima mantendo-se constante após a etapa de imobilização.

Gerhartz (1990) expõe que a imobilização de enzimas por ligação covalente tem as seguintes vantagens:

- a) As enzimas não se desprendem do suporte durante sua utilização devido à forte ligação;
- b) A enzima imobilizada pode entrar em contato facilmente com o substrato porque ela é localizada na superfície do suporte;
- c) Um aumento na estabilidade à temperatura é sempre observado em função da forte interação entre a enzima e o material do suporte.
- d) Maior resistência também à desativação pelo efeito de solventes orgânicos ou pH.

Soares e seus colaboradores (2003) testaram a albumina em comparação com o PEG na imobilização da lipase de *Cândida Rugosa* por ligação covalente em sílica silanizada e ativada com γ -aminopropiltrietóxisilano (γ -APTS) e ativada com glutaraldeído, respectivamente. Os sistemas imobilizados foram aplicados na reação de esterificação para a síntese de butirato de butila e foi avaliado o rendimento da imobilização e o tempo de meia-vida dos biocatalisadores imobilizados. O maior rendimento de imobilização (59,6%) foi obtido quando na presença de Polietilenoglicol (PEG) e o tempo de meia-vida quando na presença do aditivo passou de 64,5 h para 176 h, em comparação com o controle.

Guerfali (2009) imobilizaram β -xilosidase em quitosana ativada com glutaraldeído para posterior aplicação na síntese de xarope de xilose e xilo-oligossacarídeos. Em comparação a métodos testados, como, adsorção iônica e encapsulação, a técnica de ligação covalente ao suporte previamente ativado por glutaraldeído foi superior por resultar um derivado com alto rendimento de imobilização e atividade recuperada. O derivado imobilizado apresentou alta estabilidade operacional, retendo 94% de sua atividade inicial após 25 reutilizações na reação de hidrólise. A máxima atividade hidrolítica foi verificada em pH 8,0 e 53 °C e em pH 7,0 e 50 °C, respectivamente, para a enzima imobilizada e livre. A enzima imobilizada foi eficiente na síntese de xilo-oligossacarídeos na presença de elevada concentração de xilose.

Zhang e colaboradores (2009a), imobilizaram covalentemente cloroperoxidase de *Caldariomyces Fumago* em membranas de quitosana ativadas com 0,8 mol/L de glutaraldeído em pH 3,5. Na conversão de mono-organoclorado em diorganoclorados a 50 °C por 40 min, o derivado reteve 40% da atividade inicial enquanto a enzima livre reteve apenas 0,02%. Após 20 h, a atividade residual do derivado imobilizado foi superior ao da livre, 99 e 58%, respectivamente.

Zhang e seus colaboradores (2009b), imobilizaram Pululanase covalentemente em esferas magnetizadas de quitosana preparadas via polimerização fotoquímica com magnetita (Fe_3O_4) em suspensão aquosa, seguida de ativação com glutaraldeído. O processo de imobilização deslocou o pH ótimo da enzima livre em 0,5 unidades para a região mais ácida (pH 5,0). A

estabilidade térmica e operacional do derivado de Pululanase foi superior à enzima livre.

Simões e colaboradores (2011), imobilizaram lipase de *Cândida Rugosa* por ligação covalente em matriz híbrida SiO₂-quitosana obtida pela técnica sol-gel e ativada com epícloridrina. Um estudo comparativo entre a lipase livre e imobilizada foi realizado em termos de pH, temperatura, parâmetros cinéticos e estabilidade térmica. A atividade catalítica máxima da lipase livre foi em pH 7,0 e 45 °C e do derivado imobilizado foi em pH 7,5 e na faixa de temperatura de 40-50 °C. O derivado imobilizado resultante foi 9 vezes mais estável que a lipase solúvel a 50 °C.

Valerio (2012) desenvolveu um trabalho com o objetivo de imobilizar a enzima β -D-frutofuranosídeo frutohidrolase, avaliando a atividade hidrolítica do biocatalisador. Os métodos de imobilização foi ligações covalente, considerando as características das matrizes utilizadas, aplicando, assim, diferentes métodos de ativação. Os melhores resultados foram adquiridos usando a grande área superficial presentes nas nano e agregados de nanopartículas de quitosana, com rendimento médio de imobilização de 74% e eficiência de 62%. Parâmetros ótimos, como pH e temperatura, assim como o tempo de meia vida na temperatura ótima, não diferiram dos indicados para a forma livre da enzima, o que evidência que a ligação covalente não promoveu alterações conformacionais na proteína. A imobilização permitiu o reuso do derivado por 59 ciclos com manutenção total da atividade hidrolítica da enzima. Assim, foram alcançados diferentes requisitos para a imobilização enzimática com projeção de uso em grande escala: protocolos simples para a preparação do suporte e para a imobilização da enzima, a manutenção da atividade desta pós-imobilização, e a excelente estabilidade operacional.

2.1.2 – Reatores Enzimáticos

Um reator enzimático é um dispositivo no interior do qual as catálises enzimáticas acontecem. Para sua aplicação avaliam-se duas fases: a líquida, composta pelo substrato e aos produtos dissolvidos, e a sólida, composta pelo biocatalisador (Illanes e Altamirano, 2008). Na Figura 4, observa-se os tipos mais comum de reatores.

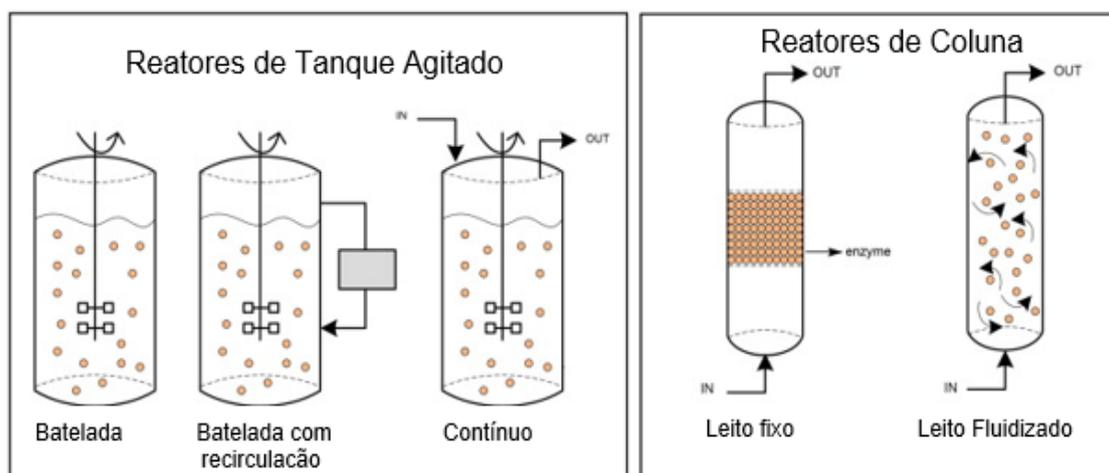


Figura 4 – Representação dos principais modelos de Reatores (Poppe *et al.*, 2015 modificado).

A escolha do reator é crucial para permitir uma adequada mistura do meio sem provocar danos a matriz de imobilização, que poderia resultar no rompimento do suporte de imobilização. Os parâmetros principais que devem ser levados em consideração na escolha do tipo de reator para o uso de biocatalisadores imobilizados são (Pilkington *et al.* 1998; Poppe *et al.* 2015):

- i. Características da matriz de imobilização utilizada (partículas, membranas ou fibras),
- ii. Cinética da reação (possíveis inibições),
- iii. Construção do biorreator (geometria e condições operacionais),
- iv. Custo operacional do biorreator (energia e manutenção),
- v. Método de imobilização empregado,
- vi. Modo de operação (batelada ou contínuo),
- vii. Natureza do substrato (sólidos em suspensão ou coloidais),
- viii. Requerimentos de transferência de massa (principalmente suprimento de oxigênio e remoção de gases),

- ix. Requisitos operacionais da reação (controle de temperatura e fluxo),
- x. Substituição do catalisador e regeneração (tempo morto operacional).

Diversas configurações de reatores têm sido sugeridas para utilização de enzimas imobilizadas em operações contínuas, onde tais biocatalisadores são confinados em colunas e utilizados em um sistema de fluxo, sendo utilizados repetidamente enquanto permanecerem ativos, baixando os custos e tempo de produção. (Girelli e Mattei, 2005).

Os reatores mais utilizados em operações contínuas são os de leito fixo, no qual a enzima imobilizada é mantida dentro do reator com o fluxo de substrato constante. Tem como vantagens a facilidade de operação, o elevado volume de leito e redução da tensão de cisalhamento sobre as enzimas imobilizadas, o que resulta em maior estabilidade (Hama *et al.*, 2011).

No reator de leito empacotado a desvantagem é o desvio do comportamento ideal do fluxo, levando à formação de caminhos preferenciais, o que prejudica as taxas de produção através de limitações à transferência de massa. Apesar da simplicidade de design e baixo custo, este tipo de reator é mais utilizado em fermentações anaeróbicas (Canilha *et al.*, 2006).

No reator de leito fluidizado as partículas de enzima imobilizada são mantidas em um balanço hidrodinâmico entre a gravidade e as forças promovidas pelo fluxo de substrato ascendente. Tem como vantagem facilitar o transporte de massa, levando a um aumento da eficiência do processo (Filtvedt *et al.*, 2010). Tais reatores incorporam as características positivas dos reatores de mistura e de leito empacotado tais como baixa tensão de cisalhamento e facilita a mistura entre as fases líquida e sólida. Ainda apresentam limitações relativas ao fluxo, sua estabilização e exigem do catalisador resistência ao atrito (Canilha *et al.*, 2006).

O reator de leito fluidizado estabilizado magneticamente (MSFBR) tem inúmeras vantagens sobre o leito fluidizado convencional, como a baixa variação de pressão através do leito, eliminação de resíduos sólidos da mistura, facilidade de transporte de sólido, possibilidade de operação de aumento de velocidade de fluidos e até mesmo a operação em contracorrente (Liu *et al.*, 2009). Assim a fluidização assistida magneticamente surge como a técnica que preserva as

características do leito fluidizado associado com um campo magnético externo que controla a distribuição das partículas de biocatalisadores no reator, impedindo o empacotamento do leito, diminuindo o atrito entre as partículas e preserva a queda de pressão no leito, além de facilitar o transporte de massa e assim permitir o aumento da velocidade do fluxo (Hristov e Fachikov, 2007).

Liu e seus colaboradores (2009) realizaram um estudo objetivando investigar o desenvolvimento da fermentação do etanol no MSFBR com células *Saccharomyces Cerevisiae* imobilizadas em alginato com partículas magnéticas. E a produtividade do etanol foi maior no MSFBR que em um reator de leito fluido convencional, sem campo magnético. Na Figura 5 observa-se um esquema de um MSFBR.

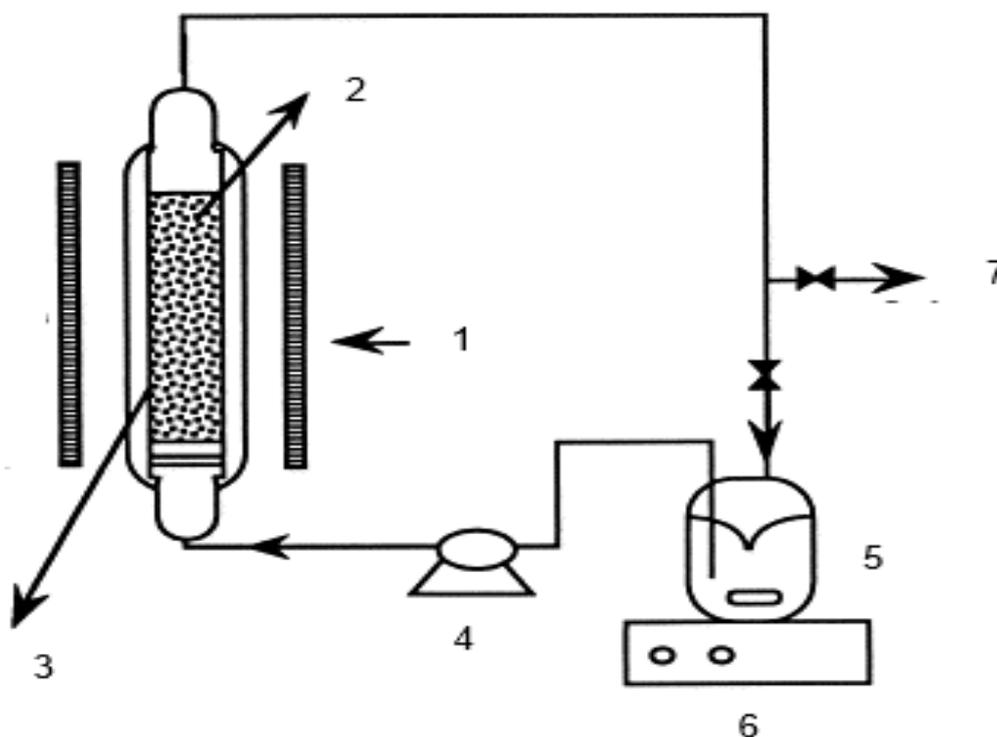


Figura 5 – Diagrama esquemático de um MSFBR. 1) Bobinas de fio de cobre, 2) Coluna de vibro preenchida com os suportes magnéticos imobilizados, 3) Revestimento de aquecimento, 4) Bomba peristáltica, 5) Reservatório, 6) Agitador magnético e 7) Válvula de segurança (Zhou et al., 2014).

2.1.3 – Nanomateriais Magnéticos

A nanotecnologia é uma área de estudo grande e multidisciplinar que se baseia em diferentes tipos de materiais, como: cerâmicas, compósitos, metais, polímeros, semicondutores e biomateriais (Durán, *et al.*, 2006). A crescente ênfase nas pesquisas nessa área justifica-se pelas propriedades desses materiais quando em escala nanométrica, as quais são alteradas pelo controle de tamanho e morfologia das nanopartículas (Lu *et al.*, 2007).

Os nanomateriais possuem alta capacidade para diferentes aplicações, como, processos catalíticos (Lu *et al.*, 2004) fluidos magnéticos (Figueiredo, 2008), tintas magnéticas (Nedkov, 2006), descontaminação ambiental, recobrimento de discos rígidos e memórias magnéticas para armazenamento de informações (Sun, 2006b), entre outras.

Às nanopartículas magnéticas (NPM) têm se destacado das diversas nanopartículas de diferentes materiais por ter algumas de suas propriedades magnéticas drasticamente alteradas com os efeitos de tamanho e a grande área de superfície. As propriedades magnéticas das NPMs são uma combinação da sua composição atômica, da sua estrutura cristalina e do efeito do seu tamanho (Lodhia *et al.*, 2010). São compostas por elementos magnéticos, como cobalto, ferro, níquel, e seus óxidos, entre outros, e podem ser manipuladas através de um campo magnético externo (Gubin, 2009).

Os materiais magnéticos são categorizados pela sua resposta quando exposto um campo magnético estático, de acordo com a sua susceptibilidade magnética. A susceptibilidade e a permeabilidade são parâmetros importantes para descrever o comportamento magnético dos materiais. Os materiais diamagnéticos, paramagnéticos e antiferromagnéticos não possuem magnetização macroscópica espontânea, ao contrário dos ferromagnéticos e ferrimagnéticos (Luqueze, 2006).

Curvas de magnetização, como a apresentada na Figura 6, são curvas de magnetização induzida (M) versus campo magnético aplicado (H) e variam de acordo com o tipo de substância. Ao ser aplicado um campo externo o material segue a curva até atingir um patamar constante de magnetização, ponto chamado de magnetização de saturação, M_s , no qual M torna-se constante em

altos valores de H . Se após a saturação, o M não é reduzido a zero ao reduzir a zero o H , ocorre a chamada histerese, e observa-se um valor residual de magnetização remanescente, M_r . Campo Coercivo, H_c , é o valor no qual a magnetização se anula para um determinado valor de campo magnético (Cullity e Graham, 2009).

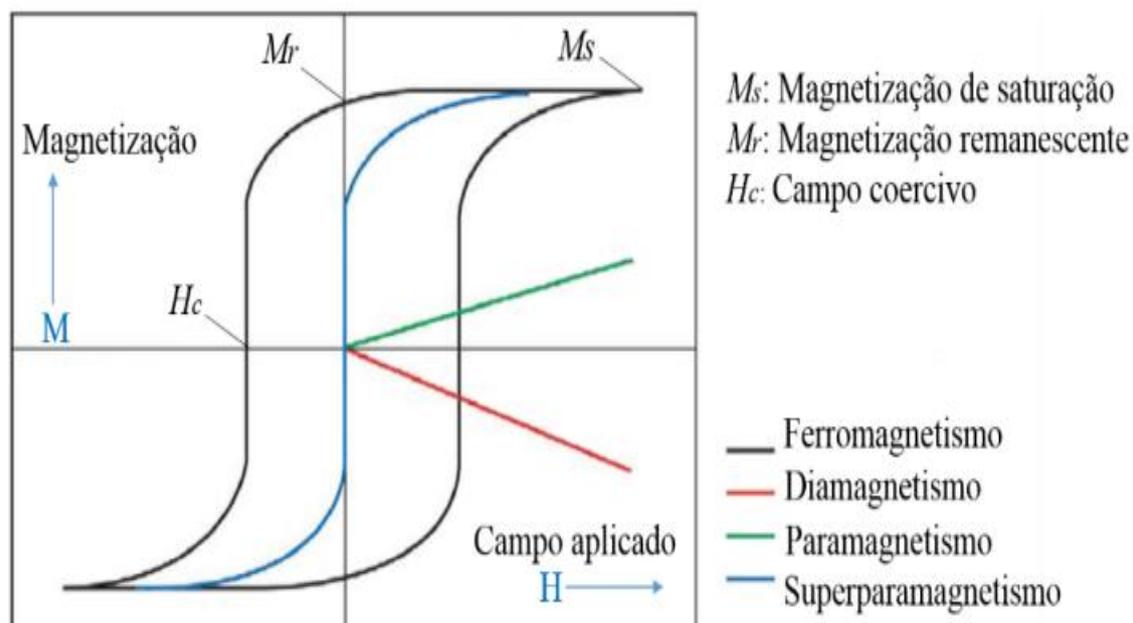


Figura 6 - Curvas de histerese características de NPs ferromagnéticas, diamagnéticas, paramagnéticas e superparamagnéticas e valores de remanescência, M_r , e campo coercivo, H_c (Arruebo *et al.*, 2002).

Os momentos magnéticos atômicos das partículas superparamagnéticas, estão alinhados paralelamente a H , não existe nenhuma histerese e a M_r e o H_c são nulos. A susceptibilidade magnética destes materiais situa-se entre a dos ferromagnéticos e dos paramagnéticos, de 10^{-6} a 10^{-1} emu, e não apresentam magnetização espontânea (Cullity e Graham, 2009).

Uma das mais importantes e almeçadas propriedades do NPM é comportamento superparamagnético, no qual partículas nanométricas possuem um único domínio magnético ao aplicar-lhe um campo magnético externo. Tal capacidade é chamada de coercitividade, em partículas magnéticas maiores que 20 nm os domínios magnéticos se alinham em vários sentidos (Akbarzadeh *et al.*, 2012).

Propriedades magnéticas em suportes enzimáticos é um benefício expressivo, pois ao manter um elevado valor de saturação de magnetização, a lipase imobilizada pode ser facilmente separada da mistura de reação usando um magneto. Bem como, o biocatalizador magnético tem seu movimento controlado de forma eficiente no reator durante a reação, utilizando um campo magnético (Xie *et al.*, 2009).

Robinson e colaboradores (1973) foram os primeiros a utilizarem a separação magnética em biotecnologia, trabalharam com sílica e celulose ambas com óxido de ferro (magnetita) como matriz para imobilizar duas enzimas: α -quimotripsina e β -galactosidase para aplicações em biorreatores. A partir desse estudo, a separação magnética tem se tornado uma ferramenta cada vez mais popular para o processo de separação de moléculas biológicas e células.

Estudos na área de biotecnologia comprovam que NPMs contendo enzimas e proteínas apresentam uma alta resposta magnética quando expostos a um campo magnético externo. Assim, é crescente o interesse e pesquisas de NPMs na separação magnética de várias substâncias na biocatálise (Gawande *et al.*, 2014) e como suportes na imobilização de enzimas (Atacan e Özacar, 2015).

2.1.3.1 – Magnetita (Fe_3O_4)

As nanopartículas (NP) de óxido de ferro são superiores a NPs de demais metal, por conta da estabilidade e biodegradabilidade. De todos os óxidos de ferro, a magnetita (Fe_3O_4) é a que apresenta as propriedades mais atraentes, pela presença de cátions de ferro em dois estados de oxidação, Fe^{2+} e Fe^{3+} , em estrutura de espinela inversa onde a estrutura cristalina para uma célula unitária é mostrada na Figura 7 (Gubin, 2009).

A magnetita é um material ferromagnético, porém, à nano-escala (<20 nm), as NPs de óxido de ferro são superparamagnéticas. Com a redução do seu tamanho, a partícula passa a se comportar como um único dipolo magnético, apresentando assim um alto momento magnético. Com isso, tais NPs são facilmente magnetizáveis ao aplicar um campo magnético externo e perdem a magnetização quando esse campo é retirado, evitando, assim, a aglomeração das partículas (Laurent *et al.*, 2011).

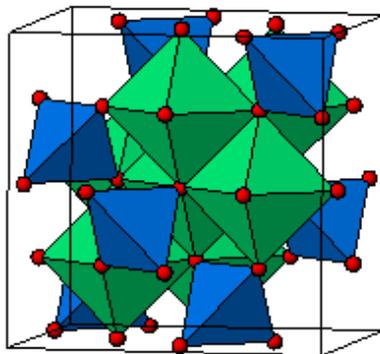


Figura 7 – Poliedro de Ferro na célula unitária de magnetita (azul é ocupado por Fe^{3++} , verde é ocupado por Fe^{2+} , Fe^{3+} e oxigênio em vermelho) (Rebello, 2009).

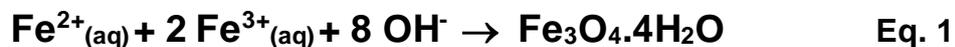
Além da capacidade de formar monodomínios a diminuição do tamanho das NPM faz com que grande parte dos átomos que constituem o material se concentre na superfície. NPM apresentam efeitos de superfície devido à quebra de simetria da rede cristalina e reúnem boa parte dos momentos magnéticos nessa camada. Assim, a razão superfície/volume aumenta, o que altera as propriedades químicas e magnéticas, tal característica é favorável para funcionalização das NPM com os mais diferentes compostos (Lacava, 2004).

2.1.3.2 - Síntese de NPM por Coprecipitação

A síntese de NPM por métodos físicos, como deposição de fase gasosa e litografia por feixe de elétrons, são procedimentos sofisticados e com incapacidade de controle do tamanho das partículas na escala nanométrica. Já por métodos químicos, a síntese é mais simples e mais eficiente no controle de tamanho, composição e, até, forma das nanopartículas (Gupta e Gupta, 2005). Mahmoudi e colaboradores (2011) citaram que cerca de 90% das NPM são sintetizadas por procedimentos químicos.

O método da precipitação é o método químico mais simples, rápido e barato para a obtenção de NPMs. A coprecipitação, segundo a Equação 1, dos sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} na razão molar 1:2 em um meio alcalino é a mais comum, devido à baixa temperatura de reação requerida, às propriedades hidrofílicas da superfície das partículas obtidas e a simplicidade e eficiência da técnica (Lin *et al.*, 2008; Petcharoen e Sirivat, 2012). Este método apresenta inúmeras outras vantagens como: baixo custo, economia de tempo, fácil ampliação de escala,

homogeneidade química, partículas finas com distribuição de tamanho estreita e pós com boa reatividade, uniformes com fraca ou nenhuma aglomeração (Janasi, *et al.*, 2002).



As variáveis que mais influenciam nas propriedades das partículas coprecipitadas são: pH final, tipo de sais utilizados (cloretos, sulfatos, nitratos, percloratos, etc.), ordem de adição dos reagentes, concentração dos sais, razão molar entre os sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} , força da base usada, temperaturas, velocidade de agitação, e outras (Janasi *et al.*, 2002; Gupta e Gupta, 2005; Lodhia *et al.*, 2010). Tais variáveis afetam à natureza, a homogeneidade, o tamanho, o comportamento magnético e a energia da superfície das partículas resultantes (Janasi *et al.*, 2002).

A concentração dos sais de Fe^{2+} e Fe^{3+} na mistura inicial da reação é o que tem maior influência o tamanho global das MNP. Em 1992, Jolivet e colaboradores demonstraram que a razão entre Fe^{2+} e Fe^{3+} influencia o resultado final, a razão de 1:2 correspondeu a magnetite estequiométrica, sendo as partículas resultantes homogêneas em tamanho e composição. Wei e colaboradores (2007) também demonstram que a razão molar entre Fe^{2+} e Fe^{3+} deve ser mantida em 1:2 pois assim obtêm-se partículas de magnetita com qualidade mais elevada.

O pH e a temperatura também são parâmetros determinantes nas propriedades da magnetita sintetizada. Kim e colaboradores (2003) demonstraram que a magnetita (Fe_3O_4) deveria ser obtida com um pH entre 9 e 14. Em 2006(a), Sun e seus colaboradores provaram que as nanopartículas de Fe_3O_4 reduzem o seu tamanho com o aumento da temperatura, até atingir 50° C, e a partir dessa temperatura aumentavam o seu tamanho com o aumento da temperatura.

A velocidade de agitação é mais um dos parâmetros que podem alterar o tamanho das partículas resultantes. O aumento da taxa de agitação da solução gera partículas de diâmetros reduzidos quando comparadas as obtidas com taxas de agitação menores. Pois, uma maior taxa de agitação leva a fase

dispersa a apresentar uma distribuição homogênea e uniforme ao longo do líquido minimizando assim as chances de formação de partículas maiores. A ordem de adição dos reagentes também pode interferir na homogeneidade (Valenzuela *et al.*, 2009)

Souza (2011) desenvolveu um estudo em que nanopartículas magnéticas foram avaliadas em função dos parâmetros físico-químicos que influenciam diretamente as características finais do produto (pH, molaridade, temperatura e tipo de base) para se observar a influência de cada um nas características do produto. As melhores condições de síntese para o método de coprecipitação foram obtidas através da temperatura de síntese abaixo de 70° C; agitação a mais vigorosa possível; concentração molar da base em 8M, sendo o KOH a base mais eficiente e pH ajustado no intervalo entre 9 e 11. Os demais parâmetros estudados pouco afetaram as características físico-químicas das NPMs sob as condições de síntese desse trabalho.

2.1.3.3 – Revestimento e Funcionalização de NPM

As NPM têm superfícies hidrofóbicas com uma grande área superficial em relação ao volume. Pelas interações hidrofóbicas entre as partículas, estas unem-se e formam aglomerados com forte atração magnética dipolo-dipolo entre elas. Além dessas forças de atração entre as partículas, cada partícula está no campo magnético vizinho, tornando-se mais magnetizada. (Lin *et al.*, 2008; Lodhia *et al.*, 2010)

Para uma estabilização eficiente das NPs de óxido de ferro é conveniente revesti-las (Gupta e Gupta, 2005). As moléculas geralmente utilizadas para a estabilização das NPM são os surfactantes, como ácido oleico (Mahmoudi *et al.*, 2011), citrato de sódio e triton X-100, entre outros. A modificação na superfície das NPM permite maior resistência destas em contato com o ar, estabilidade ao pH, estabilidade coloidal e a ligação com agentes externos, devido a inserção de grupos funcionais na superfície das nanopartículas (Holla *et al.*, 2015).

Os surfactantes são moléculas com uma parte hidrofílica (polar) e outra parte hidrofóbica (apolar). A parte polar é geralmente chamada de “cabeça” e a parte não polar de “cauda” da molécula de surfactante. As moléculas de surfactante podem atuar evitando a nucleação, crescimento e a aglomeração

das partículas. O impedimento estérico causado pela ligação de um surfactante pode ser observado na Figura 8. (Mahmoudi *et al.*, 2011).

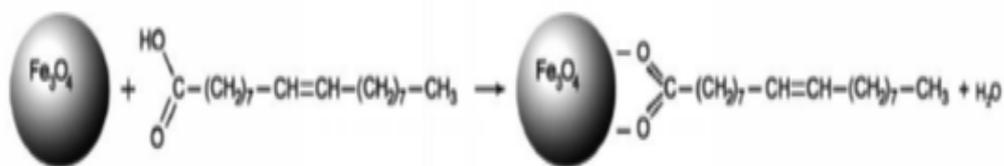


Figura 8 – Interação entre o grupo COOH- de ácido oleico e o átomo de ferro, formando um impedimento estérico (Mahmoudi *et al.*, 2011).

Alguns materiais utilizados para o núcleo como óxidos de ferro, são facilmente oxidados, alterando as propriedades esperadas das nanopartículas. Há diversas formas das NPM alcançarem a solubilidade e estabilidade em água. Alguns desses métodos incluem o revestimento com carboxilatos (como ácido cítrico, citrato de sódio e ácido oleico), com polímeros sintéticos (como PEG, PVA, PEO e triton X-100) e com polissacarídeos naturais (como dextrano e quitosana) (Lin *et al.*, 2008).

Diversas enzimas podem ser imobilizadas em superfícies de NPM por meio de funcionalização da superfície com uma ampla variedade de grupos funcionais, incluindo amina, aldeído, carboxílico, epóxi e maleimida (López-Serrano, 2002). Com a funcionalização, as atividades enzimáticas e as estabilidades são significativamente melhoradas (Guo, 2004).

A modificação superficial do suporte pode ocorrer pela adição de grupos funcionais específicos e é aplicada também como pré-requisito para a imobilização de uma enzima em uma superfície sólida (Wu *et al.*, 2012). A modificação superficial utilizando agentes silanizantes baseia-se na silanização com organosilanos, a qual ocorre por meio da reação entre grupos reativos do tipo alcoxi (metoxi, etoxi) presentes em alcoxissilanos mono, bi ou trifuncionais e os silanóis superficiais da matriz inorgânica.

Dentre estes agentes, os mais utilizados são 3-aminopropiltrimetoxissilano, 3-aminopropiltriethoxissilano e 3-cloropropiltrimetoxissilano, epícloridrina, glutaraldeído, glioxal, formaldeído, 1-etil-

3- [3-dimetilaminopropil] carbodi-imida, etilenodiamina, glicidol, carbonildiimidazol e outros (Mendes *et al.*, 2011).

A estrutura do 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), Figura 9, é um organossilano, uma molécula bifuncional contendo grupos alcóxidos que podem se ligar covalentemente aos grupos oxigênio na superfície das nanopartículas, modificando-as com grupos amina ($-NH_2$) (Kim *et al.*, 2006).

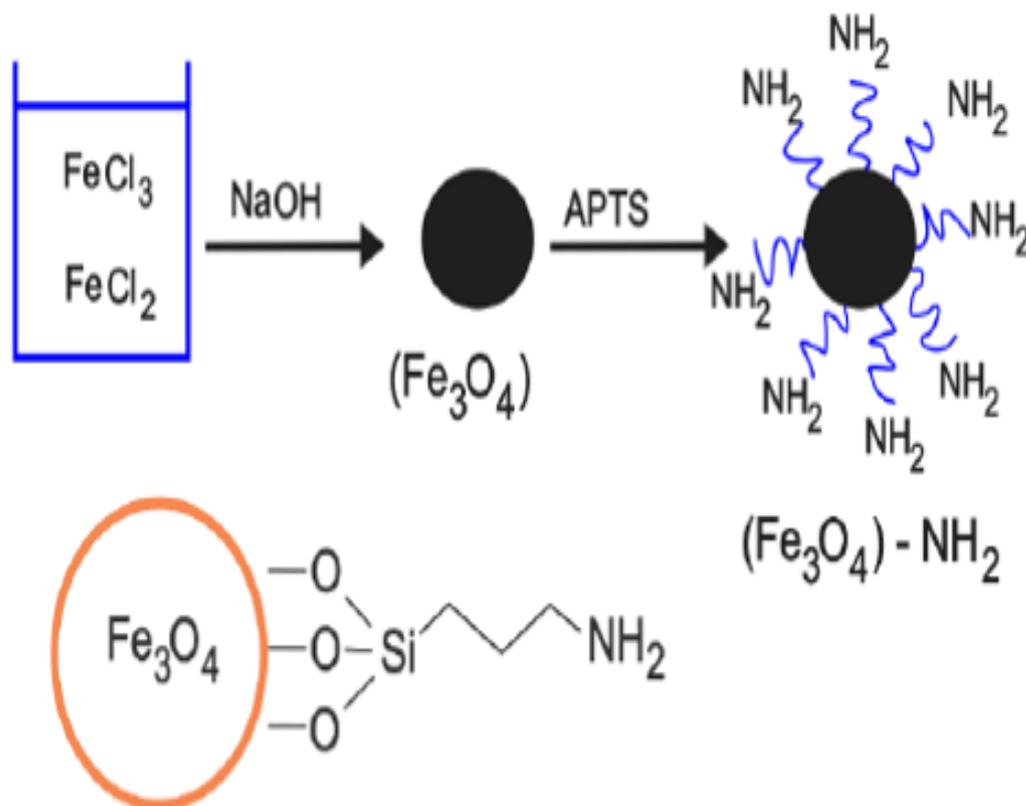


Figura 9 - Síntese de nanopartículas magnéticas modificadas com APTS introduzindo grupos aminas (Rocha 2016).

2.1.4 – Suportes para imobilização

Tardioli (2003) evidência que a imobilização em suportes sólidos insolúveis é uma das táticas de estabilização (térmica e ao pH) de enzimas mais pesquisada, por, conseqüentemente, obter outras vantagens. Como, facilidade de separação do produto final e de controle do processo, o uso contínuo e repetido da atividade catalítica e redução do volume de reação (alta

concentração de enzima em menor volume de reator). Tais vantagens tornam a tecnologia de imobilização atrativa para fins industriais.

Os quesitos mais relevantes na seleção de um suporte são (Villeneuve *et al.*, 2000):

- i. área superficial;
- ii. capacidade de carga;
- iii. capacidade de regeneração;
- iv. durabilidade química e funcional;
- v. estabilidade térmica;
- vi. morfologia e composição;
- vii. natureza hidrofílica;
- viii. permeabilidade;
- ix. resistência microbiológica e
- x. solubilidade.

Das características citadas, a estabilidade mecânica do suporte é fundamental para as aplicações de enzimas imobilizadas, pois pode limitar o biocatalisador ao causar desintegração do catalisador durante o processo, o que pode influenciar a atividade catalítica, estabilidade de armazenamento, operacional e térmica (Liese, 2003).

O material utilizado como suporte pode alterar a quantidade de água total nas proximidades da enzima e a partição dos reagentes e/ou produtos na mistura reacional. Assim, o balanço hidrofílico/hidrofóbico da superfície do suporte é crucial, já que na etapa de preparação de suportes hidrofóbicos a água pode ficar retida nos interstícios porosos e, portanto, ao redor da enzima imobilizada (Talbert e Goddard, 2012).

É necessária uma certa quantidade de água no microambiente para preservação da estrutura conformacional da enzima (Cantone *et al.*, 2013), uma vez que as enzimas precisam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, mesmo se ligadas covalentemente a um suporte, já que, a água contribui para a sua integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, além de limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

As características da matriz são de fundamental importância na determinação do desempenho da enzima imobilizada. Pode-se resumir como condições principais para um material ser um suporte adequado (Bon *et al.*, 2008; Mendes, 2009; Castro *et al.*, 2008):

- i. Características físicas (adequadas para uso no reator selecionado);
 - o Características Mecânicas (comportamento de compressão, tamanho da partícula, diâmetro do poro, área superficial, volume acessível da matriz, resistência à compactação em operações com altas vazões para reatores de leito fixo, abrasão para reatores agitados e velocidade de sedimentação para leitos fluidizados)
 - o Características morfológicas (quanto maior a área superficial, com porosidade bem definida para permitir o acesso do substrato à enzima, maior a probabilidade de imobilização de quantidades significativas do biocatalisador);
 - o Porosidade compatível com as dimensões do biocatalisador a ser imobilizado.
- ii. Características químicas;
 - o Deve haver grupos químicos que possam ser ativados ou modificados no suporte, permitindo a ligação com a enzima, sem desnaturá-la
 - o Natureza hidrofílica (suportes hidrofílicos de modo geral permitem uma melhor difusividade do substrato em comparação aos hidrofóbicos, por isso é preciso avaliar o grau de hidrofilia, pois a quantidade de água altera o microambiente suporte-enzima-substrato);
 - o Não ser tóxico para enzimas
- iii. Custo (atrelado à disponibilidade e facilidade de obtenção);
- iv. Estabilidade química, mecânica e térmica (capaz de resistir frente às condições de ativação, durante o processo de imobilização, e no decorrer das reações);

Pesquisas na área de biocatálise citam diversos tipos de suporte, como: derivados poliméricos naturais e materiais inorgânicos, como celite, vidro com

porosidade controlada, sílica, zeólitas, silicatos, cerâmica, matrizes inorgânicas. O elevado valor dos suportes mais comuns impulsionou a busca por suportes de menor custo. Dentre os quais, os polímeros obtiveram destaque, por proporcionarem uma maior estabilidade à enzima, resultando numa maior mobilidade molecular, expondo seu sítio ativo ao meio reacional, levando a um alto rendimento na atividade (Grigolon *et al.*, 2001).

Os suportes podem ser classificados de acordo com sua composição e morfologia. A Tabela 2 ilustra os diferentes tipos de suportes.

Tabela 2 – Classificação dos suportes de acordo com a composição (Galvão, 2004)

Suportes				
Orgânicos		Inorgânicos		
Naturais		Sintéticos	Minerais	Fabricados
Polissacarídeos	Proteínas	Poliestireno	Areia	Vidro (PC)
Celulose	Colágeno	Poliacrilatos	Bentonita	Cerâmica (PC)
Agarose	Albumina	Polivinilos	Homeblenda	Sílica (PC)
Agar	Gelatina	Nylon	Pedra-pome	Aluminossilicato
Quitosana	Seda	Poliamidas		Óxido de Ferro
Amido		Vinil		Óxido de Níquel
		Policrilamidas		

A maioria dos suportes não tolera o acoplamento direto da enzima, sendo preciso uma etapa de ativação. Utilizam para isso reagentes ativadores como os brometos de cianogênio e reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos ou aldeídos (Galvão, 2004).

Os suportes inorgânicos são de interesse por sua durabilidade, alta resistência mecânica e baixo custo (Zhou e Hartmann 2013, Bon *et al.* 2008). Para a preparação de um biocatalisador, antes da união com a enzima, é necessário um pré-tratamento da superfície do suporte, como a silanização. Os

silanos disponíveis comercialmente incluem epoxisilanos, aminosilanos, cianosilanos, fenilsilanos e, dentre eles, o mais usado é o APTS. Após a silanização, é preciso realizar modificações químicas no suporte (ativação) para troca dos grupos funcionais que posteriormente se utilizarão na união com a proteína. Geralmente utiliza-se para ativar o suporte um reativo bifuncional, como por exemplo, o glutaraldeído (Mendes *et al.*, 2013; Mendes *et al.*, 2011). Como foi ilustrado na Figura 10.

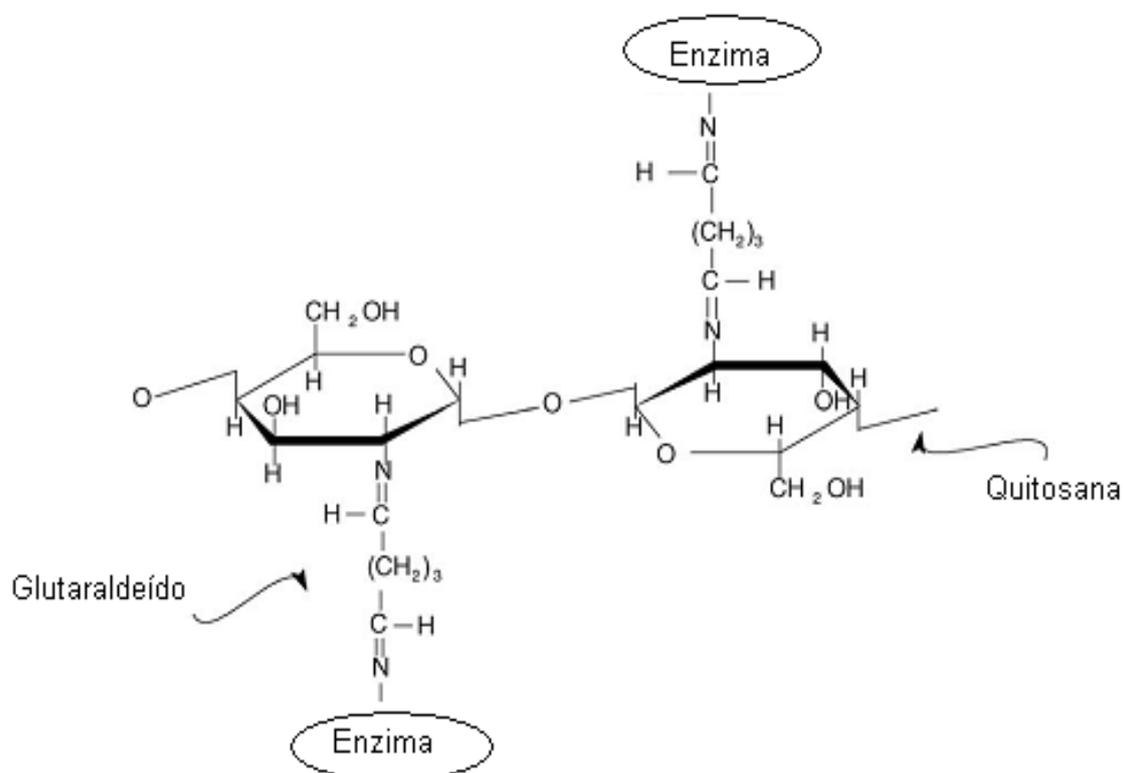


Figura 10 – Ilustração esquemática da imobilização covalente da enzima em microesferas de quitosana ativadas com glutaraldeído (Huang *et al.*, 2005).

Rocha (2016) formulou nanopartículas magnéticas a partir da coprecipitação de sais de ferro seguida da reação de silanização com APTS. Tais suportes foram ativados com Glutaraldeído antes da imobilização, como representado na Figura 11. A atividade enzimática apresentou bons resultados e a imobilização foi realizada com sucesso. A Lipase imobilizada apresentou maior valor de atividade a 50 °C, em comparação à Lipase na forma livre. Este resultado representa uma vantagem de aplicação do biocatalisador em

processos que necessitam de maiores temperaturas, como por exemplo, a síntese de biodiesel.

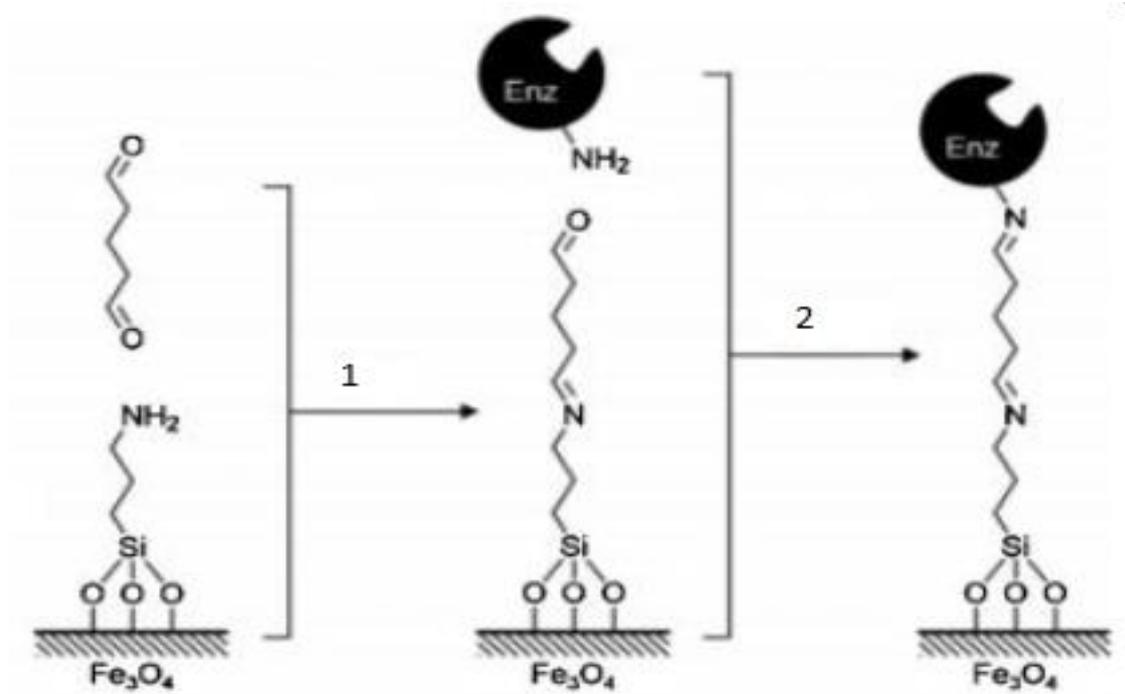


Figura 11 – 1) Glutaraldeído foi ligada à nanopartículas funcionalizada com APTS; 2) lipase foi imobilizado sobre a partícula ativada por ligação covalente (Rocha, 2016).

Os suportes podem ser porosos ou não-porosos. Os porosos apresentam grande área superficial interna disponível para a imobilização e assim protege a enzima contra turbulências externas. Na imobilização em tais suportes, seus poros devem ter tamanho suficiente para permitir a acomodação da enzima e o acesso do substrato. Suportes porosos podem implicar em dificuldades difusionais para entrada de reagentes e saídas de produtos, principalmente quando os substratos são macro-moléculas (Galvão, 2004).

Um parâmetro importante a ser otimizado num biocatalisador selecionado é a quantidade de água, já que, as enzimas precisam de uma pequena quantidade de água para reter a sua conformação tridimensional ativa, pois a água contribui para a sua integridade estrutural, polaridade do sítio ativo e estabilidade da proteína, além de limitar a solubilidade de substratos hidrofóbicos em torno da enzima (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004).

2.1.4.1 – Formulação de Suportes Com Partículas Magnéticas

Várias técnicas são descritas na literatura para a preparação de microesferas e tal método de obtenção representa um fator crucial para as características físico-químicas como distribuição de tamanho e morfologia, e, conseqüentemente, determina o comportamento destas em relação à encapsulação e liberação de princípios ativos (Rosca, 2004).

As microesferas poliméricas podem ser preparadas por meio de métodos físico-químicos, como, aspersão em torre de secagem (spray drying), coacervação, difusão do solvente, emulsão seguida da evaporação do solvente, inchamento osmótico, miniemulsão, poliadição ou policondensação. Partículas de biopolímeros, como caseína, gelatina, e quitosana têm sido largamente formuladas por de métodos físico-químicos (Ramos, 2006; Bruschi *et al.*, 2003).

Segue a seguir um resumo dos métodos mais comuns para formulação de partículas magnéticas;

1) Aspersão em torre de secagem

Também chamada de nebulização ou spray drying trata-se de um processo de pulverização e secagem de partículas líquidas e sólidas. O procedimento se baseia na pulverização de uma solução ou suspensão polimérica em uma câmara de secagem, no qual a mistura líquida é dividida sob a forma de finíssimas gotículas para dentro da câmara de secagem cujo interior circula ar aquecido. A rápida evaporação da água mantém baixa a temperatura das partículas, de maneira que a alta temperatura do ar de secagem não prejudique o produto (Gouin, 2004).

Os parâmetros cruciais de controle de secagem para as características do produto obtido são: distribuição de temperatura e umidade, fluxo do ar de secagem, geometria da câmara, temperatura de entrada e saída do ar, tempo de resistência da amostra e parâmetros de injeção da amostra (Goula, 2005).

Ortiz e colaboradores, 2009, utilizaram a técnica de spray drying para encapsular caseína hidrolisada usando a proteína isolada de soja como material de revestimento. As microcápsulas formadas apresentaram tamanho entre 9,2 e

11,3 μm e ausência de porosidade. Houve aumento da hidrofobicidade do material encapsulado após a formação das cápsulas.

2) Coagulação

Também é chamado de método de inversão de fase. A coagulação é um procedimento simples e não necessita de aparatos sofisticados. Nesta metodologia uma solução de quitosana em ácido acético é gotejada em uma solução de hidróxido de sódio e, no momento em que as soluções entram em contato, a quitosana se solidifica. É uma das técnicas mais escolhidas pelos autores. (Rorrer et al., 1993; Dias et al., 2008; Magalhães et al., 2008)

Ao entrar em contato com a solução coagulante (NaOH), a gota da solução de quitosana começa a se solidificar em forma de esferas. A uniformidade e a geometria regular, são obtidas a partir do controle de alguns ajustes, tais como: a altura da queda da gota, em relação a superfície do coagulante, a velocidade do fluxo e da agitação mecânica e saída do gás inerte. Em muitos casos quando a solução de quitosana, apresentar uma densidade menor do que a solução coagulante, ao entrar em contato com a mesma, a geometria da gota irá sofrer deformações, apresentando então uma geometria oval e não esférica (Dias et.al. 2008, Prados 2011).

3) Emulsificação/evaporação do solvente

Tem sido comumente aplicado devido à simplicidade dos procedimentos envolvidos e à possibilidade de otimização das características físico-químicas das partículas pela escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (BHARDWAJ, 1995). Nesse método, é emulsificado em uma fase aquosa, contendo um agente estabilizante, uma solução de polímero em um solvente orgânico volátil. Tal solvente é removido por aquecimento, vácuo ou pela adição de um solvente extrator. A formação das partículas é influenciada por diferentes fatores, destacando-se a agitação e natureza do estabilizante e dos solventes (VILA-JATO 1997).

2.1.4.2 – Ativação de Suporte

Suportes minerais ou orgânicos são usados para imobilização, porém para que haja ligação covalente, o suporte precisa ser previamente ativado. Tal ativação equivale a incorporar grupos químicos que reagem com as cadeias laterais da proteína. Diversos métodos de ativação são avaliados, sendo o glutaraldeído o mais utilizado. (Villeneuve *et al.*, 2000). As ativações mais frequentes são feitas com brometo de cianogênio, reagentes bifuncionais contendo grupos epóxidos, como o dioxirano ou aldeídos, como o glutaraldeído (Tardioli, 2003).

O glutaraldeído, visto na Figura 12, é uma molécula bifuncional com grupos aldeídos que interage muito fortemente com grupos aminos livres, com menor intensidade, com o grupo tiol. (Hajdu e Friedrich, 1975).

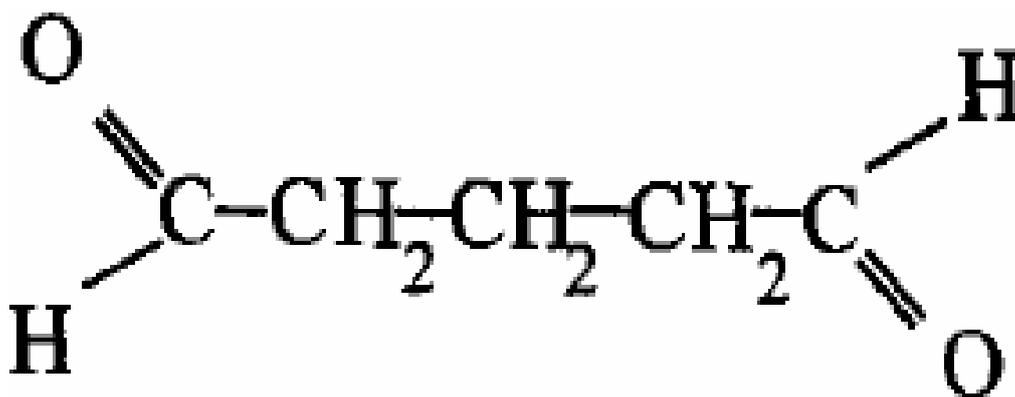


Figura 12 - Estrutura molecular do glutaraldeído (Monteiro-Junior e Airoidi,1999).

Tal interação do glutaraldeído com o grupo amina livre tem sido muito explorada em áreas distintas, destacando-se, a imobilização de enzimas (Weetall e Detar, 1975), empregando uma gama muito vasta de diferentes enzimas e suportes. Na reação da quitosana com glutaraldeído, ocorre ataque nucleofílico dos grupos amino da quitosana aos grupos carbonílicos do glutaraldeído.

2.1.4.3 – Matrizes Polímeros Naturais

Polímeros naturais têm tido importância fundamental em aplicações diversificadas para o avanço científico e oferecem diversas vantagens, como, biocompatibilidade, biodegradabilidade e fácil obtenção (Azevedo *et al.*, 2007).

Com o grande desenvolvimento da Química dos Polímeros, que se deu em meados da década de 50 após a Segunda Guerra Mundial, os pesquisadores utilizavam os polímeros naturais para servirem como base para a busca de similares sintéticos. Devido à consciência ecológica e a busca por matérias-primas renováveis, esses compostos estão ganhando gradativamente sua importância no uso industrial (Mano, 2001).

2.1.4.3.1 – Quitina e Quitosana

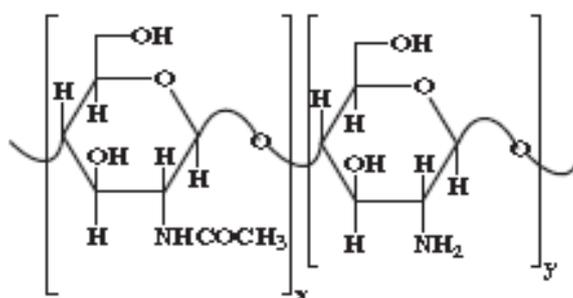
O alto custo dos suportes usuais (baseados em sílica e polímeros sintéticos) levou a uma procura por suportes mais baratos como CaCO_3 , palha do arroz, ou quitina e quitosana. De tais alternativas, a quitina e seu derivado, a quitosana, aparecem como os mais atrativos visto que quitina é o segundo mais abundante biopolímero na natureza (Pereira *et al.*, 2003).

Quitina e quitosana são polímeros atóxicos, de baixo custo, biocompatíveis e biodegradáveis, de fontes naturais renováveis. Ambas as estruturas são compostas por unidades de 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopirranose e 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose unidas por ligações glicosídicas β (1 \rightarrow 4), os polímeros diferem quanto à proporção relativa dessas unidades e quanto à solubilidade. Na estrutura da quitina predominam unidades de 2-acetamido-2-deoxi-Dglicopirranose e é insolúvel na maioria dos solventes, já a quitosana é predominantemente formada por unidades de 2-amino-2-deoxi-D-glicopirranose e é solúvel em soluções aquosas diluídas de ácidos (Roberts, 1992).

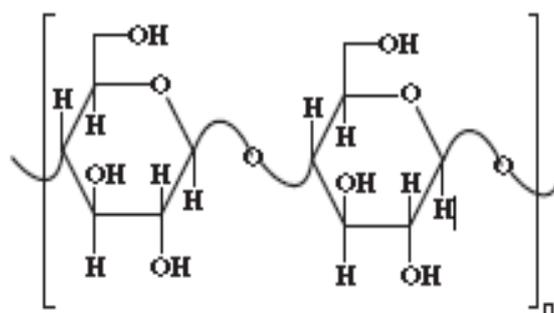
A quitina é separada dos demais componentes da carapaça de crustáceos por um processo químico que envolve as etapas de desmineralização e desproteínização das carapaças com soluções diluídas de HCl e NaOH, seguida de descoloração com KMnO_4 e ácido oxálico, por exemplo. A quitina obtida, o biopolímero contendo grupos acetil (NHCOCH_3), é desacetilada com solução concentrada de NaOH, produzindo a quitosana. (Goosen, 1996)

Normalmente denominado poli[(1-4) -N-acetil-D-glicosamina] ou N-acetilglicosamina e com estrutura química muito semelhante à da celulose, como pode ser observado na Figura 13, a quitina é um dos poucos polieletrólitos catiônicos presentes na natureza, diferentemente dos outros polissacarídeos naturais, que se apresentam neutros ou negativamente carregados (Abazinge *et al.*, 1993).

A quitosana, termo usado para identificar 60% ou mais de unidades desacetiladas, é aplicada em vários processos de imobilização de enzimas pelas suas diferentes configurações geométricas tais como pó, hidrogéis, membranas e fibras e pela presença de diferentes grupos funcionais em sua estrutura (Krajewska, 2004).



Estrutura da Quitina e Quitosana



Estrutura da Celulose

Figura 13 - Estrutura química da quitina, quitosana e celulose (Abazinge *et al.*, 1993).

Há grupos hidroxilas (OH) na estrutura geral de vários biopolímeros, a principal diferença da quitosana é a presença de grupos amino (NH₂) na estrutura. Este biopolímero é solúvel em meio ácido diluído, e forma um polímero catiônico, com a protonação do grupo amino gerando o íon NH₃⁺, que resulta em

propriedades especiais diferenciadas em relação, por exemplo, às fibras vegetais (Berger *et al.*, 2004)

A quitosana tem enorme versatilidade, sendo aplicada em diversas áreas devido as suas características biológicas, físicas e químicas, como: habilidade de quelar metais, resistência de tensão, capacidade para formar filmes e atividade bactericida (Tharanathan e Kithur, 2003). Tais características são intensamente influenciadas pela área específica, grau de desacetilação e massa molar média (Cruz, 2007).

Tharanathan e Prashanth (2007) estudaram a quitina e a quitosana, investigando suas modificações e aplicações, comprovando que as áreas de aplicações da quitina/quitosana e seus derivados são ilimitados, já que podem ser obtidos na forma de fibras, microesferas e nanopartículas. São mencionadas aplicações na área de alimentos e nutrição, ciência dos materiais, ciências médicas e farmacêuticas, imunologia, microbiologia, imunologia dentre outras.

A formulação de microesferas é uma tática de incremento da capacidade de imobilizar da quitosana, já que as microesferas possuem uma área superficial cerca de 100 vezes maior do que a quitosana em flocos. Além de as microesferas apresentarem cinéticas de reação mais rápidas e maior facilidade de manuseio e operação. Pesquisas mostram que a quitosana pode ser utilizada para preparar microesferas para diferentes propósitos, essa versatilidade permite a formulação de microesferas de diferentes formas e tamanhos, envolvendo diversos produtos e derivados (Denkbas *et al*, 2002).

O uso de microesferas de quitosana porosa em partículas apresenta inúmeras vantagens no processo de imobilização de enzimas, como, podemos destacar (Denkbas *et al*, 2002):

- i. ser um material de origem natural (biopolímero), e assim, seguro para o uso e biocompatível;
- ii. quantidade de poros se apresenta de maneira uniforme desde a superfície até seu interior, provendo, portanto, grande difusão do substrato;
- iii. e presença abundante de grupos amina altamente reativos disponíveis para imobilizar.

Pode-se destacar ainda, que a quitosana sendo um polissacarídeo, apresenta a vantagem de ter alta estabilidade em solventes orgânicos em adição a hidrofiliabilidade e a porosidade dos produtos formados (Denkbas *et al*, 2002).

A imobilização covalente em quitosana ativada por glutaraldeído é o método mais empregado em função dos grupos amino existentes na estrutura da quitosana que reagem com este agente em condições brandas. Vieira (2009) realizou um estudo onde β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* foi imobilizada em suportes orgânicos por diferentes métodos. A imobilização da enzima em hidrogel de quitosana coagulado com KOH e ativado com glutaraldeído obteve maior atividade catalítica. A imobilização não alterou os valores de pH e temperatura. Obteve uma boa estabilidade operacional da enzima, mantendo 83% de sua atividade inicial após quatro ciclos de hidrólise de lactose a 40 °C e pH 7.

2.2 – Produção De Biodiesel Com Biocatalisadores

Políticas de proteção ambiental tem ganhado destaque, visando principalmente a produção energética. O uso de biocombustíveis apresenta inúmeros benefícios, incluindo sustentabilidade, redução dos gases estufa, desenvolvimento regional, social e agrícola. (Torres *et al.*, 2006).

Biodiesel é como nomeiam os ésteres alquílicos de ácidos graxos que atendam certos parâmetros de qualidade (Biodiesel Standard, 2008). Definiu-se pela “National Biodiesel Board” como o derivado mono-álquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, derivado de fontes renováveis, com quantidade de energia e propriedades físicas e químicas semelhantes ao óleo diesel convencional, tendo seu uso associada à substituição de combustíveis fósseis (National Biodiesel Board, 1998; Canakci, 2007).

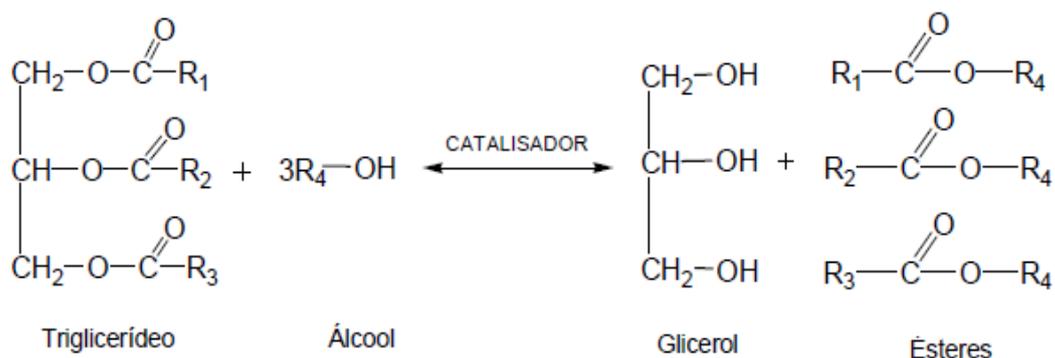


Figura 14 - Esquema resumida da reação de produção de biodiesel (Costa *et al.*, 2000).

Na produção do biodiesel, o óleo retirado de certas plantas ou animais (87%) é misturado com etanol ou metanol (12%) na presença de um catalisador (1%). Tal processo químico, a transesterificação, resulta em dois produtos: ésteres (biodiesel, 86%) e glicerina (produto valorizado no mercado de sabões, 9%) e uma mistura de álcoois reprocessáveis. A Figura 14 mostra o esquema de produção do biodiesel (Furigo *et al.*, 2009).

A produção de biodiesel por transesterificação catalisada por enzimas ainda não é aplicada comercialmente, porém, grandes avanços têm sido publicados em artigos. Os pontos comuns em tais estudos almejam otimizar as condições de reação (pH, solvente, temperatura, tipo de micro-organismo que gera a enzima, etc.) no intuito de estabelecer aplicação industrial. Porém, o rendimento e tempo de reação ainda são desfavoráveis frente a catálise alcalina (Narasimharao *et al.*, 2007).

As limitações na obtenção de produtos e intermediários de interesse industrial resultam do tipo de catalisadores químico, que são pouco versáteis, exigem altas temperaturas, possuem baixa especificidade, fornecem produtos de composição química mista ou produtos contaminados, requerendo uma etapa posterior de purificação (Hasan *et al.*, 2006). Ranganathan *et al.* (2008), apresentaram um fluxograma comparando as etapas do processo de catálise básica e o processo com biocatalisadores, representado pela Figura 1.

A produção de biodiesel com uso de enzima imobilizada tem sido apontada como eficaz, apresentando bons rendimentos e podendo assim, ser uma rota alternativa ao sistema tradicional de produção com catalisadores

homogêneos básicos (Conti *et al.*, 2001). As enzimas mais estudadas e empregadas nos processos de catalise para produção de biodiesel são as lipases de origem microbiana, sendo as mais relevantes em estudos a *Candida Rugosa*, *Pseudomonas Fluorescens*, *Rhizopusoryzae*, *Burkholderiacepacia*, *Aspergillusniger*, *Thermomyceslanuginosus* e *Rhizomucormiehei* (Rodrigues, 2009).

Alves e seus colaboradores (2005) realizaram um estudo sobre o reaproveitamento de lipase comercial imobilizada na transesterificação do óleo de babaçu. As enzimas foram reutilizadas em diversas reações para verificar a perda da atividade e seu grau de contaminação. Os resultados mostraram que a enzima não apresentou grande perda de atividade podendo ser utilizada em diversos ciclos de produção.

Iso e seus colaboradores (2001) realizaram um estudo que trata da produção de biodiesel através da reação de transesterificação utilizando lipase imobilizada, que foi realizado através de partículas de caulita porosa como um portador. Resultados mostram que a lipase *Pseudomonas fluorescens* imobilizada tem maior atividade que a lipase livre.

Teixeira (2011) desenvolveu biocatalisadores com propriedades magnéticas visando aplicações futuras na produção de biodiesel em biorreatores assistidos por campos eletromagnéticos. Os biocatalisadores imobilizados foram preparados utilizando uma lipase comercial de *Pseudomonas fluorescences* por três diferentes procedimentos de imobilização. Os derivados imobilizados por interação direta da enzima com os suportes (adsorção física e ligação covalente) apresentaram rendimentos da ordem de 30% e as melhores atividades hidrolíticas foram alcançadas pelos derivados imobilizados por ligação covalente nos suportes de alginato com quitosana ativados com glutaraldeído, os quais alcançaram rendimentos da ordem de 50%.

Román e colaboradores avaliaram a síntese enzimática de biodiesel de óleo de coco em um biorreator assistido por campo eletromagnético, utilizando lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizado em quitosana com propriedades magnéticas como biocatalisador. Os parâmetros de reação ótimos foram maximizados no reator de modo diferencial às 12 h, com razão molar de óleo:

álcool de 1: 11,25; Temperatura de reação a 47,5 ° C e indução magnética dos 9,7 mT.

Rós e colaboradores, 2014, obtiveram o biodiesel de babassu utilizando a lipase de *Burkholderia cepacia* imobilizada em SiO₂-PVA como catalisador num reactor de microondas. Sob condições ótimas, a conversão total foi atingida num tempo de reação de 10 h. O produto purificado não continha compostos ligados ao glicerol, como verificado por RMN. Além disso, outras propriedades, tais como gravidade específica (870 kg m⁻³) e viscosidade (4,2 mm² s⁻¹), estão de acordo com as especificações padrão do combustível.

Rodrigues e colaboradores, 2012, abordaram a preparação de biocatalisadores magnéticos visando futuras aplicações na produção não convencional de produção de biodiesel por bioprocessos magneticamente assistidos. Dois tipos de portadores, baseados em quitosana e alginato de cálcio foram testadas, com e sem magnetita (Fe₃O₄) como fase magnética disperso, para a imobilização de *Yarrowia lipolytica* e *Rhizopus oryzae*. Os resultados mostraram que tanto o conteúdo magnético como o método de imobilização afetam a resistência mecânica do portador, a estabilidade e, conseqüentemente, o desempenho catalítico dos mesmos.

Silva e colaboradores, 2012, utilizaram a lipase pancreática porcina (PPL) imobilizada numa matriz híbrida para catalisar a transesterificação do óleo de palma com diferentes álcoois de cadeia curta. O biocatalisador comercial, Lipozyme IM20, foi utilizado para comparação. O sistema reacional óleo/butanol mostrou ser o substrato mais adequado para realizar a reação com ambas as preparações enzimáticas, atingindo rendimentos semelhantes superiores a 75%. Obtiveram-se rendimentos mais baixos (<55%) para os outros sistemas de reação, e a lipase pancreática imobilizada mostrou melhor desempenho do que a Lipozyme IM20.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – Materiais

- 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), fornecido pela Sigma Aldrich;
- Acetona, fornecida pela Vetec;
- Ácido Acético, fornecido pela Vetec;
- Ácido Clorídrico, fornecido pela Vetec;
- Ácido Oleico, fornecido pela Synth;
- Albumina Bovina Fração V, fornecida pela Sigma Aldrich;
- Álcool Etilico fornecido pela Cromoline;
- Amano Lipase AK, from *Pseudomonas Fluorescens*, fornecida pela Sigma-Aldrich;
- Bradford reagente, fornecido pela Bio-Rad
- Cloreto de ferro III (ICO) hexahidratado, fornecido pela Vetec;
- Goma arábica em pó pura, fornecido pela Synth
- Glutaraldeído, solução 50%, fornecido pela Vetec;
- Hidróxido de Amônia, 30%, fornecida pela Vetec;
- Hidróxido de Sódio, fornecido pela Vetec;
- Quitosana fornecida pela Sigma Aldrich (PM 161g/mol);
- Polietilenoglicol (PEG-1500) fornecido pela Sigma Aldrich (PM 1500);
- Sulfato ferroso II (OSO) heptahidratado, fornecido pela Vetec;

❖ Todos os solventes empregados foram de grau analítico (PA).

3.2 – Preparação e Caracterização dos Suportes

3.2.1 – Formulação de Nano Magnetitas

Para a preparação das NPM (Fe_3O_4) estabilizada foi empregado o método da co-precipitação. Duas metodologias foram inicialmente testadas e a que mostrou melhor resultado na caracterização de morfologia, tamanho e agregação foi escolhida para continuidade no trabalho.

A formulação das NPM foi seguida da modificação superficial da mesma. Duas formas com diferentes modificações foram feitas com amostras de NPM. Uma amostra (M-AO) foi modificada com ácido oleico afim de diminuir a agregação e outra amostra (M-APTS) foi sinalizada com APTS para se tornar possível a imobilização direta de enzimas na superfície.

3.2.1.1 Método de Gnanaprakash (2007)

No reator, sob atmosfera de nitrogênio (E) e temperatura de 50°C (D) foram adicionados os sais de ferro ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) na proporção 1:2 e água deionizada, resultando num volume total de 200 mL (A), com agitação de 600 rpm (F) por 5min. Em seguida foi adicionado hidróxido de amônia 8 mol/L até alcançar o pH 10 e ficou em agitação por 5 min. Aumentou-se a temperatura a 80°C e corrigiu-se o pH para 8 por meio de adição de uma solução aquosa (4%) de ácido clorídrico (Figura 15).

3.2.1.2 – Método de Rocha (2016)

No reator (A), sob atmosfera de nitrogênio (E), foi preparada uma solução de hidróxido de sódio em 198,4 mL água destilada até atingir pH entre 11 e 13. Essa solução foi aquecida, sob agitação de 600 rpm (F), até 60°C (D). À parte, foi dissolvido $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e $\text{FeCl}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ na proporção (1:2, respectivamente) em 10 mL de água destilada num balão em atmosfera inerte. Posteriormente foram adicionados 1,6 mL desta solução mais o agente modificador (Figura 15).



Figura 15 – Reator IKA-250 localizado no setor de polímeros LAMAV

3.2.1.3 – Modificação da Nano Magnetita

As modificações foram feitas logo em seguida ao método de coprecipitação:

- Para as amostras modificadas com Ácido Oleico:
Foi adicionado um volume de 4 mL de ácido oleico lentamente e deixou-se agitar por 1 hora.
- Para as amostras modificadas com APTS:
Foi adicionado um volume de 88,5 μ L de APTS no reator e agitados por 1 hora.

O processo de lavagem e secagem foi o mesmo para ambas modificações. Após o término do experimento foram realizadas três lavagens

com água destilada e álcool etílico, descartando-se o sobrenadante, e as nanopartículas foram armazenadas.

Assim como nos métodos de co-precipitação adotados, os métodos de modificação tiveram os valores de temperatura, pH, velocidade e concentração de modificadores adaptados baseado na bibliografia (Alves, 2012; Aquino et al., 2002; Ewijk et al., 1990; Mahdavi et al., 2013; Morais et al., 2001).

3.2.2 – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das NPM

As análises de dispersão e do tamanho aproximado das nanopartículas modificadas foram realizados através da microscopia eletrônica de transmissão (MET), usando um equipamento de marca JEOL, 1400Plus, (120 kV), disponível no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) do CBB/UENF com a colaboração do Professor Flávio C. Miguens. Essas micrografias foram obtidas utilizando este microscópio eletrônico que é de alta resolução.

As amostras de nanomagnetitas primeiro foram dispersas em álcool isopropílico, e levadas a uma cuba ultrassônica para melhor dispersão. A solução dispersa foi gotejada em grades de 2 mm (recobertas com uma camada de polímero) e secas por 24 horas, à temperatura ambiente.

A partir dessa análise foi possível escolher o melhor método de co-precipitação dos sais de ferro e tal amostra seguiu nas etapas de caracterização, ativação e imobilização.

3.2.3 – Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR) das NPM

A absorção de radiação pelas moléculas de uma substância causa transições nos estados rotacionais e vibracionais dos átomos ou grupos atômicos. Essas vibrações fornecem informações a respeito das ligações químicas dos constituintes atômicos, isto porque cada ligação absorve um comprimento de onda específico para alterar seus estados roto-vibracionais. Através desta radiação absorvida é possível identificar as ligações presentes, os

grupos químicos, entre outras características, e foi possível confirmar assim se houve modificação na superfície das NPM (Souza, 2006).

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo alternado em um equipamento IRPrestige-21 Shimadzu disponível na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial de Materiais LAMAV/CCT/UENF, para identificar a composição das NPM. As amostras foram maceradas, dispersas em KBr e prensadas em forma de pastilhas. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

3.2.4 – Caracterização por Difração de Raios-X das NPM

Esta análise foi realizada com o intuito de identificar a estrutura cristalina e determinar a composição das fases das NPM, assim como determinar o tamanho médio do cristalito formado.

Os difratogramas das NPM modificadas foram obtidos a partir de um difratômetro disponível no LDRX/ UFF/ Xerém, equipado com raios-x de $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda=0,1540\text{ nm}$). As varreduras foram feitas na faixa do ângulo de difração $2\theta = 2^\circ\text{-}40^\circ$, sendo utilizados com os seguintes parâmetros de medida: tensão de 40 kV, corrente no filamento de 30 mA, com radiação de cobre e com velocidade de varredura de $1^\circ/\text{min}$.

3.2.5 – Espectroscopia Mössbauer dos NPM

A espectroscopia Mössbauer é uma técnica utilizada para analisar o comportamento das propriedades de um núcleo atômico e do ambiente que o envolve, sendo fundamental para a elucidação estrutural de compostos contendo ferro (Debrassi, 2011).

As amostras de M-APTS e M-AO foram submetidas à espectroscopia Mössbauer, com o objetivo de caracterizar as propriedades magnéticas das nanopartículas. Foi realizada em um espectrômetro Halder MCA 3/1, em temperatura ambiente, ou seja, aproximadamente 300K, para investigação qualitativa e quantitativa dos óxidos de ferro. Foi realizada no Centro Brasileiro

de Pesquisas Físicas (CBPF) com a colaboração da Professora Elisa Maria Baggio Saitovitch.

3.2.6 - Formulação das Microesferas Magnéticas de Quitosana

Uma solução de quitosana 2% (m/m) foi dissolvida em solução de ácido acético (5% m/v) e posteriormente filtrada e então foi dispersa na solução de quitosana a M-AO previamente formulada para obtenção das microesferas (M-AO- Cs).

A solução, como pode ser visto na Figura 16, foi gotejada através de uma agulha (B) com o auxílio de uma bomba peristáltica (C) em uma solução de NaOH 3M (D). O diâmetro das gotas foi controlado através das condições de gotejamento (viscosidade da solução, altura e velocidade de gotejamento), como mostra a Figura 16. As microcápsulas de M-AO com quitosana (M-AO-Q) obtidas foram deixadas em NaOH por 12 h e lavadas em água destilada até obtenção de pH 7.

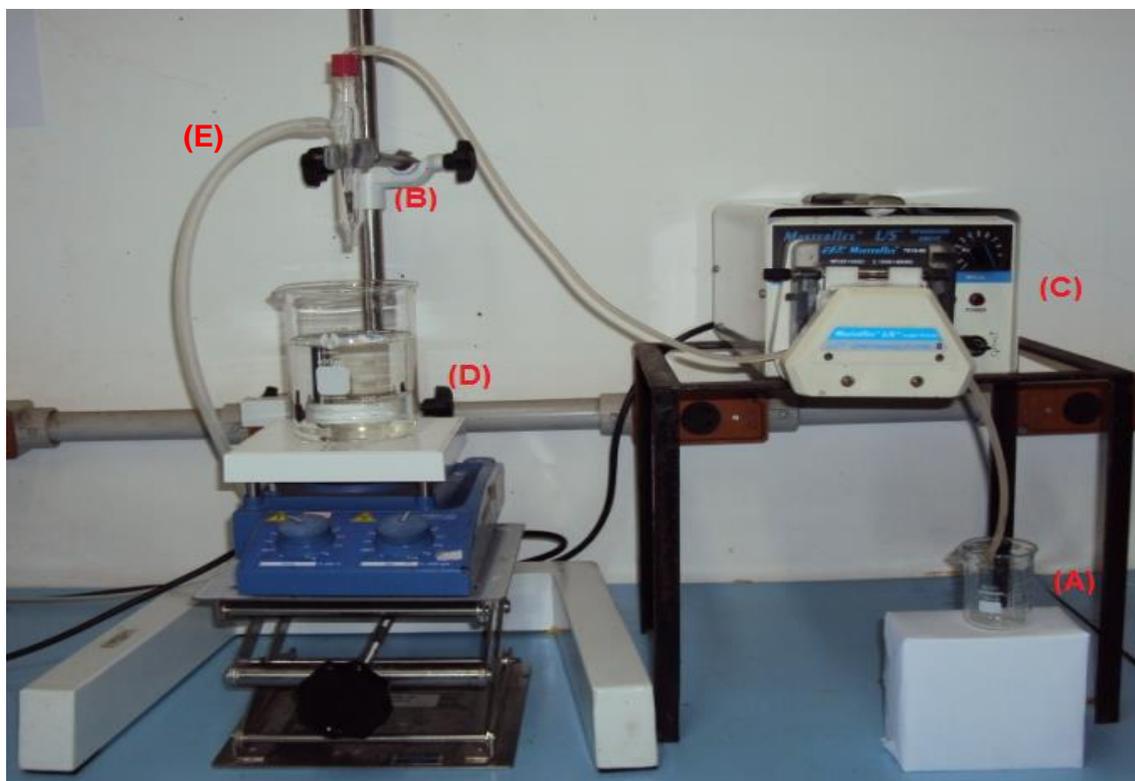


Figura 16 – Esquema para gotejamento de micropartículas de M-AO-Q.

3.2.7- Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Microesferas

A análise morfológica e o tamanho aproximado das microesferas magnéticas serão realizados através da microscopia eletrônica de varredura (MEV), de marca ZEISS, Evo 40, (10kV) , disponível no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual – LBCT CBB/UENF. Essas micrografias são obtidas utilizando este microscópio eletrônico que é de alta resolução. As microesferas são depositadas em porta amostra com fita adesiva de grafite e metalizadas.

3.2.8– Magnetometria de Amostra Vibrantes (VSM)

Esta técnica permite a obtenção de informações fundamentais dos materiais ferromagnéticos através da aquisição do ciclo de histerese dos mesmos. De tais curvas é possível extrair o campo coercivo, a magnetização de saturação e a magnetização remanente das amostras.

O princípio de funcionamento do Magnetometria de Amostra Vibrantes (VSM) baseia-se na aplicação de um campo magnético uniforme, através de um eletroímã, e da leitura da resposta magnética da amostra a este campo externo. Nesta técnica, a amostra é fixada em uma região de campo uniforme centrada entre quatro bobinas coletoras e colocada a vibrar verticalmente. O momento magnético induzido na amostra causa uma variação no fluxo de campo magnético que flui através das espiras, induzindo nas bobinas coletoras uma força eletromotriz. O valor da magnetização é obtido da força eletromotriz medida. Para a obtenção do ciclo de histerese o campo magnético é variado lentamente e a leitura da magnetização é feita para cada valor do campo magnético externo.

As propriedades magnéticas foram estudadas utilizando um magnetômetro Physical Property Measurement System (PPMS) da Quantum Design, as medidas foram feitas em temperatura ambiente 305 K aplicando um campo externo de +/- 2 Teslas, e foram realizadas no Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF) com a colaboração da Professora Elisa Maria Baggio Saitovitch.

3.2.9 - Análise Térmica (TG) dos Suportes Modificados.

A análise termogravimétrica das amostras foi realizada utilizando um sistema de análise termogravimétrica Q-5000, com sensibilidade na termobalança de 0,1 µg, nos termopares de platina de 0,001°C, disponível na Unidade de Caracterização Térmica (SEPOL/UENF). As amostras foram aquecidas a temperatura ambiente até 1000°C a uma taxa de aquecimento de 10°C/min.

Foram analisadas amostras dos suportes M-AO-Q e M-APTS. A análise térmica foi utilizada para determinação da estabilidade dos suportes.

3.3 – Imobilização das enzimas, através da técnica de ligação covalente

3.3.1 – Ativação Com Glutaraldeído das Microesferas M-AO-Q

Seguindo metodologia de Zhang e colaboradores (2009b), os suportes foram embebidos em solução de glutaraldeído 8% (v/v) em solução tampão fosfato de sódio (0,1 M) pH 7, na proporção 1:500. Sendo mantido sob agitação por 6 horas na temperatura de 30°C, com velocidade de 160 rpm. Após esse período, lavou-se o suporte 3 vezes com solução tampão fosfato (pH7) e água destilada.

3.3.2 – Ativação com Glutaraldeído da M-APTS

Seguindo metodologia de Rocha (2016), uma alíquota de 5 mL de nanopartículas funcionalizadas com APTS foi retirada e adicionada em um tubo Falcon com 18 mL de tampão fosfato 7,4. Posteriormente foram adicionados 2 mL de glutaraldeído (25%); a solução foi agitada em um vórtex e logo após permaneceu em repouso por 1 hora à temperatura ambiente. Foi lavada com álcool, água e solução tampão (duas vezes com cada solvente) para garantir a retirada do glutaraldeído.

3.3.3 – Avaliação da Ativação com Glutaraldeído por FTIR

Para avaliar a ativação e imobilização dos suportes foram realizadas análises de FTIR. Espectros de FTIR têm sido vastamente utilizados na identificação de grupos funcionais ou ligações químicas em modificações de materiais (Gonçalves et. al., 2012).

Essa técnica foi empregada para examinar mudanças nas características das estruturas químicas dos suportes M-AO-Q e M-APTS quando comparados a estes suportes quando ativados com glutaraldeído e esses suportes quando ativados com glutaraldeído e com a lipase imobilizada covalentemente.

A reticulação química de ambos suportes com o glutaraldeído ocorre a partir do nitrogênio nucleofílico do grupo amino ($-NH_2$) e a ligação $C=N$ ($\sim 1648\text{cm}^{-1}$), base de Schiff. E em ($\sim 1558\text{cm}^{-1}$) associada a ligação amina ($-NH_2$). (Mansur et. al., 2008)

Os espectros de FTIR foram obtidos no modo alternado em um equipamento IRPrestige-21 Shimadzu disponível na Unidade de Caracterização Térmica e Superficial de Materiais LAMAV/CCT/UENF, para identificar a composição das NPM. As amostras foram maceradas, dispersas em KBr e prensadas em forma de pastilhas. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 cm^{-1} a 400 cm^{-1} .

3.3.4 - Determinação de Proteína

O método para a determinação da lipase para imobilização foi o de Bradford modificado. O método baseia-se na conversão do corante Coomassie Brilliant Blue BG-250 numa forma azul intensa, quando o ânion do corante interage com grupos NH^+3 das proteínas (Bradford 1976).

Primeiro confeccionou-se uma curva padrão com BSA (1 mg/mL) com alíquotas de 0,01 a 0,3 mg/mL. Em uma placa de Elisa foram adicionadas alíquotas de 10 μ L da solução enzimática e 190 μ L de Bradford. Um branco foi

utilizado com 10 µL de água destilada e deionizada. O ensaio foi feito em tréplicas para garantir segurança no resultado.

Para a leitura da quantificação de proteína, a lipase foi solubilizada em solução tampão (5 mg/mL) pelo período de 30 min e adicionado na placa de Elisa 10 µL das amostras, com diluições de 1,2x; 1,4x; 1,6x; 1,8x e 2x. A análise foi feita em um espectrofotômetro operando em uma banda de absorbância de 595 nm. A quantidade de proteína foi então estimada plotando as leituras de absorbância referentes à curva padrão, que foi utilizado para determinar a quantidade de proteína em amostras desconhecidas.

Além das leituras da solução de enzima de partida para imobilização leu-se o líquido restante após a imobilização. Tais valores foram utilizados nos cálculos de atividade das enzimas, onde é necessário saber o valor da enzima imobilizada, que foi determinado seguindo a equação:

$$Q_i = C_{si} - C_{si} \quad \text{Eq. 2}$$

Com Q_i quantidade de enzima imobilizada, C_{si} igual a concentração da enzima livre e C_{si} a concentração de enzima após a imobilização na solução de partida.

3.3.4 – Imobilização da Lipase nas M-AO-Q-GA e M-APTS-GA

Após o período de ativação com glutaraldeído, as enzimas foram imobilizadas por ligação covalente nos suportes de acordo com a metodologia adaptada de Castro e colaboradores (2010), Pereira e colaboradores (2010) e já testado em estudos anteriores em Bôa-Morte (2014).

Para cada grama de suporte ativado, M-AO-Q-GA ou M-APTS-GA, (matéria seca), foram adicionados 200 mg de lipase na forma livre. PEG-1500 foi adicionado com a solução de enzima em um valor de 5mg/mL de suporte, com agitação durante 4 horas, em temperatura de 25°C, e seguido por período adicional de 16 horas em condições estáticas a 4°C. Os suportes imobilizados foram lavados 3 vezes em solução tampão fosfato.

Após o processo de imobilização a atividade das partículas e as massas enzimáticas e lavadas foram mensuradas segundo a metodologia descrita para determinação da atividade enzimática, com o objetivo de se conhecer a concentração de lipase AK imobilizada nas microesferas e M-APTS-GA.

3.3.5 – Determinação da Atividade Relativa

A atividade enzimática da enzima livre e imobilizada foi determinada pelo método de hidrólise de azeite de oliva de acordo com a metodologia adaptada de Li et al., 2010 e Carvalho, 2012. Uma unidade de atividade é definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação.

O preparo da emulsão foi feito pelo seguinte modo: 50 mL de azeite de oliva e 50 mL de goma arábica a 8% m/m. Em frascos de 125 mL foram adicionados: 5mL da emulsão e 2mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M pH7,0. A fim de garantir homogeneização do meio reacional, o sistema então, foi mantido sob agitação (160 rpm) a 40°C por 5 minutos. Logo após esse processo foi adicionado os respectivos suportes imobilizados, a solução enzimática, a solução da enzima livre e a solução lavada sendo feito triplicatas para cada suporte, esse sistema também ficou sob ação de uma agitação (160rpm) durante o tempo de 5 minutos.

Após esse período de incubação, a reação então foi paralisada pela adição de 10 mL de uma solução de etanol e acetona (1:1). Em seguida cada solução foi agitada com um ultra-turrax com velocidade de 8000 rpm e centrifugada por 10 minutos com velocidade de 4000 rpm. Então foi retirada de cada solução uma quantidade de 10 mL para titulação direta.

A solução foi titulada utilizando 2 gotas de indicador fenolftaleína, com o auxílio de um agitador magnético, no pipetador para titulação foi adicionado uma solução de NaOH 0,1 M. O volume gasto foi anotado para a realização dos cálculos, conforme a Equação 3 (Aguiar et al., 2010 e Barbosa et al., 2014).

$$A \text{ (U/mg)} = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^6}{t \times m} \quad \text{Eq. 3}$$

Onde:

- M = concentração molar da solução de NaOH;
- m = massa da enzima (mg);
- t = tempo de reação (min);
- V_a = volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);
- V_b = volume de NaOH gasto na titulação do controle (mL).

Já a atividade relativa foi calculada comparando a atividade do imobilizado e a atividade da solução de enzima livre (Aguiar et al., 2010).

$$U_R = \frac{U_i}{U_0} \cdot 100 \quad \text{Eq. 4}$$

Com U_R igual à atividade relativa, U₀ igual à atividade da enzima livre e U_i à atividade da enzima imobilizada.

4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados e discutidos os resultados experimentais obtidos ao longo deste trabalho.

A primeira parte desse capítulo aborda as caracterizações dos produtos obtidos pelos dois tipos de síntese utilizado, até a escolha da síntese mais adequada para a obtenção das nanopartículas de magnetita modificadas.

A segunda parte aborda as caracterizações das magnetitas obtidas pelo método escolhido por diferentes técnicas para comprovar a fase de ferro e as propriedades magnéticas do produto obtido.

A terceira parte trata da formulação dos suportes poliméricos com propriedades magnéticas constituídos de nano magnetitas e quitosana, seguido de sua caracterização.

A quarta e última parte desse capítulo trata dos processos de ativação do suporte e a imobilização da lipase nesses ambientes diferentes. Com comparação dos resultados obtidos.

4.1 – Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Essa caracterização é importante para observar a morfologia das nanopartículas, as imagens de microscopia eletrônica de varredura para as M-AO e M-APTS são apresentadas nas Figuras 17 e 18 e mostram as características morfológicas e a distribuição das nanopartículas.

A partir dessa análise foi observado as nano partículas modificadas obtidas pelos dois métodos diferentes de síntese apresentado no item 3.2.1.1 (Gnanaprakash et al., 2007) e pelo método apresentado no item 3.2.1.2 (Rocha, 2016) e a partir dessa análise foi possível escolher o melhor método de co-precipitação dos sais de ferro mais eficiente e tal amostra seguiu nas etapas de caracterização, ativação e imobilização.

Na Figura 17 observam-se micrografias de diferentes regiões das nano magnetidas modificadas com ácido oleico sintetizadas pelo método Gnanaprakash et al., 2007 em (a) e (b) e as sintetizadas pelo método Rocha, 2016 em (c) e (d).

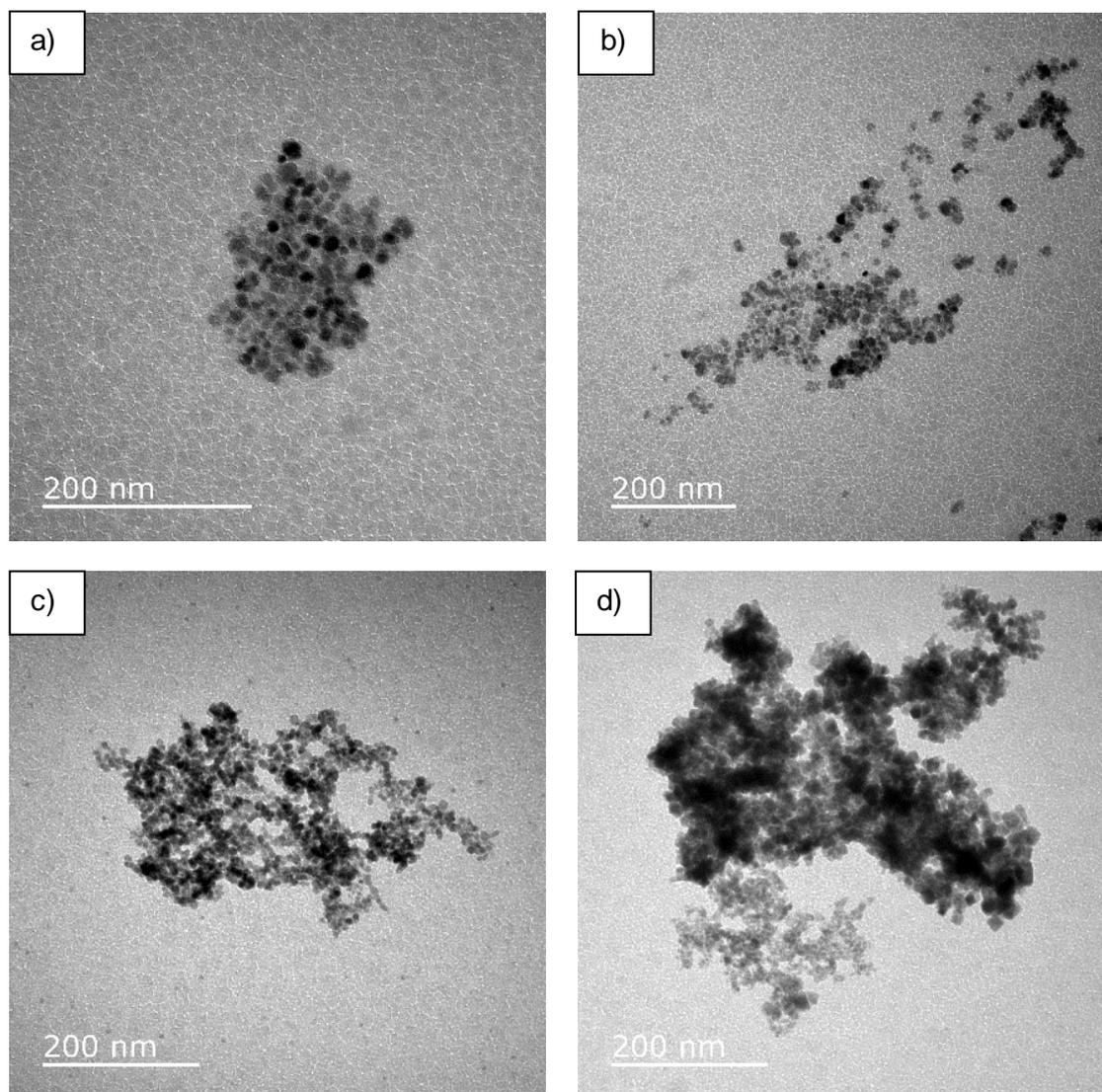


Figura 17 - Micrografia eletrônica de transmissão de diferentes regiões das nanomagnetitas modificadas com ácido oleico pelo método de Gnanaprakash et al., 2007 (a) e (b) e pelo método de Rocha, 2016 (c) e (d).

Na Figura 18 observam-se micrografias de diferentes regiões das nanomagnetitas modificadas com APTS sintetizadas pelo método Gnanaprakash et al., 2007 em (a) e (b) e pelo método Rocha, 2016 em (c) e (d).

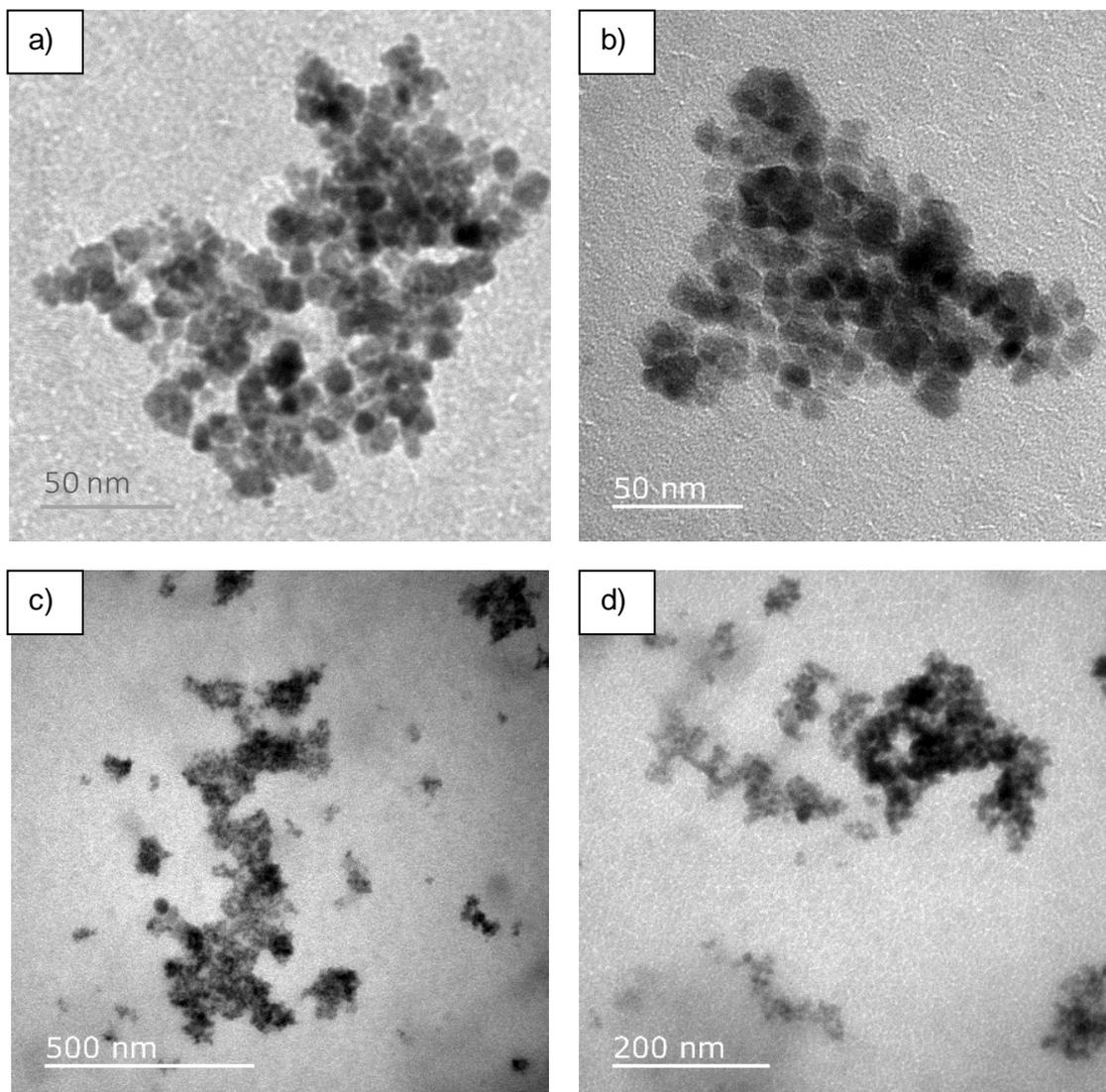


Figura 18- Micrografia eletrônica de transmissão em diferentes regiões das nanomagnetitas modificadas com APTS pelo método de Gnananprakash et al., 2007 (a) e (b) e pelo método de Rocha, 2016 (c) e (d).

As micrografias a e b, nas Figuras 17 e 18, evidenciam que o método empregado nesse caso apresentou uma melhor desagregação que o método apresentado em c e d, também nas Figuras 17 e 18.

O método de Gnanaprakash et al., 2007 originou uma desagregação uniforme apresentando nanopartículas com contornos definidos e separadas

como pretendido foi escolhido para dar continuidade ao trabalho. Na Figura 19, pode-se observar a distribuição de tamanho desse método para em (a) M-AO e em (b) M-APTS.

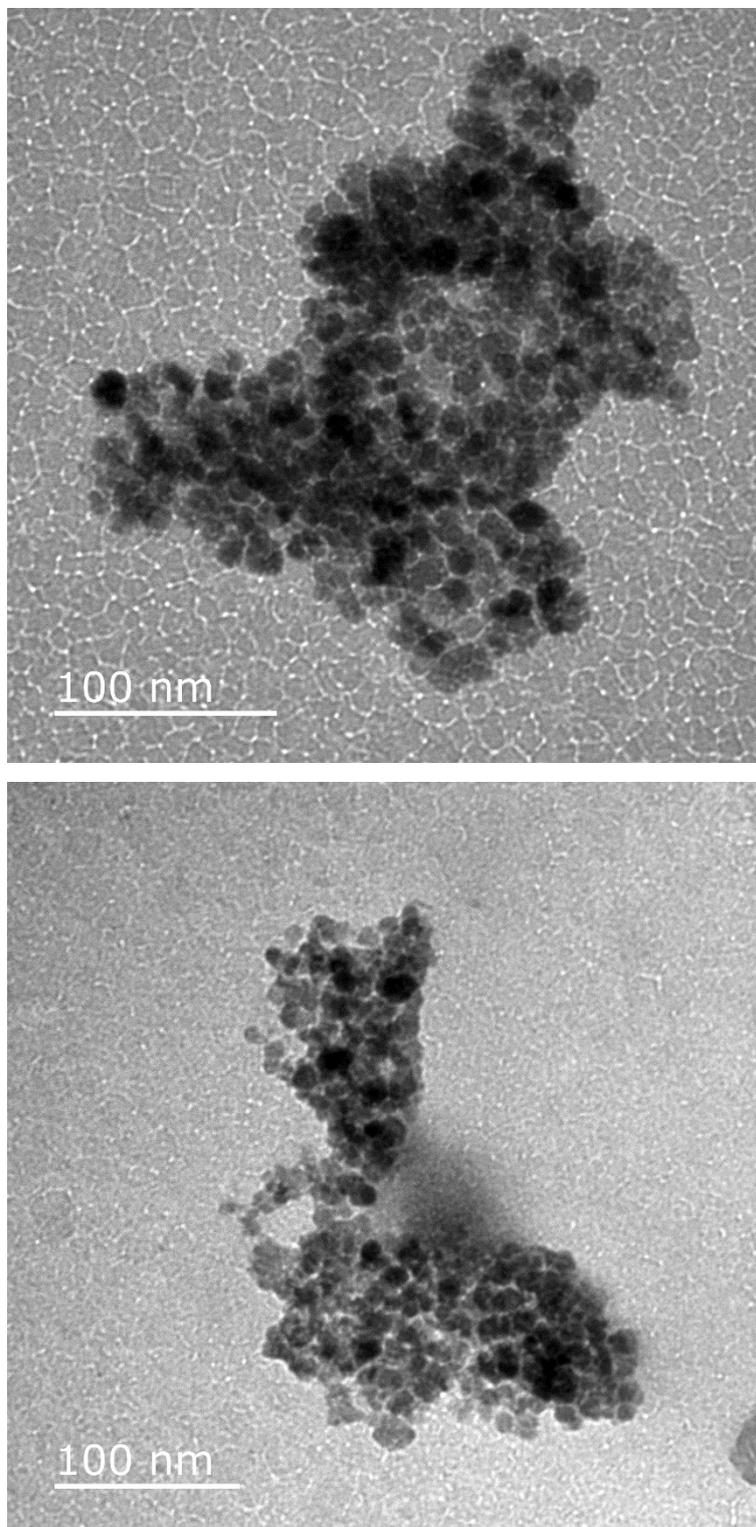


Figura 19- Micrografia eletrônica de transmissão das nanomagnetitas modificadas com AO (a) e com APTS em (b) pelo método de Gnananprakash.

Uma das possíveis causas do método Rocha ter resultado em aglomerados de partículas é a dificuldade em manter o pH na faixa ótima, favorecendo o crescimento de partículas unidas nas já existentes, com isso ácido oleico não conseguiu ser eficiente na desaglomeração das partículas, pois essas não se encontram unidas por forças de atração magnéticas e sim foram formados aglomerados durante a síntese.

Os gráficos na Figura 20 apresentam uma estimativa de tamanho médio das partículas com 50 medidas feitas nas micrografias nas Figuras 17, 18 e 19.

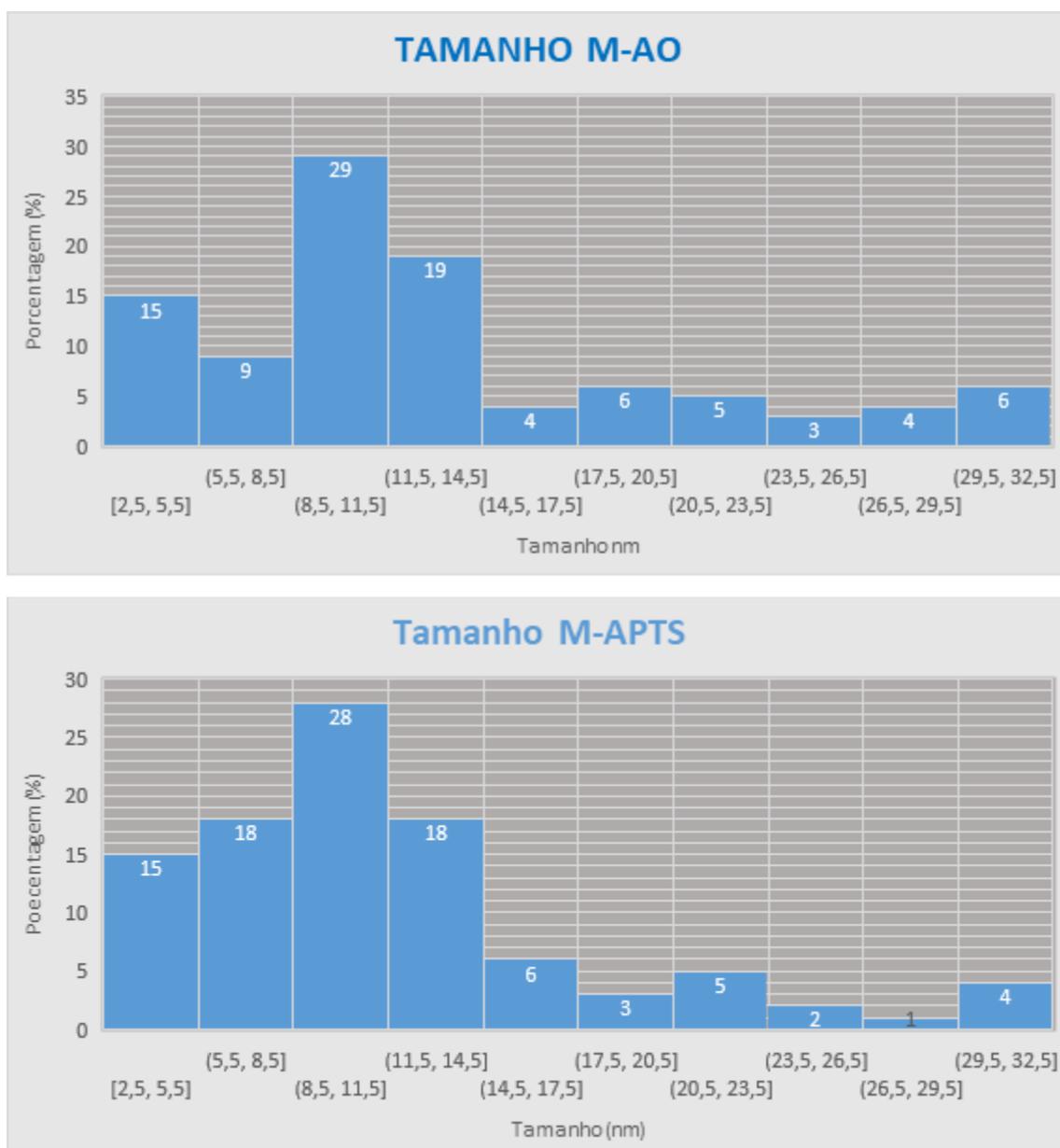


Figura 20 - Gráfico da distribuição das NP, M-AO e M-APTS.

As NP M-AO apresentou um tamanho médio de 12,7 nm, com tamanho variando de 2,5 a 32,5 nm e com 76% menores de 20 nm, valor desejável para as propriedades almejadas. Já as M-APTS apresentou um tamanho médio de 10,9 nm, com tamanho variando de 2,5 a 32,5nm e com 85% menores que 20 nm.

4.2 - Espectroscopia de Infravermelho com Transformada De Fourier (FTIR) dos Suportes Modificados

A Figura 21 ilustra o espectro de absorção na região do infravermelho realizadas para as amostras de nanopartículas magnéticas modificadas com AO e APTS.

Em ambas curvas se observa uma banda com um pico intenso na região de 570 cm^{-1} correspondente à vibração do grupamento Fe-O, picos também aparecem em aproximadamente 433 cm^{-1} e 410 cm^{-1} , ambos atribuídos à magnetita. Picos no intervalo entre 600 e 400 nm correspondente aos estiramentos ν_1 e ν_2 dos sítios tetraédricos e octaédricos da estrutura cristalina do espinélio inverso (Nascimento, 2016).

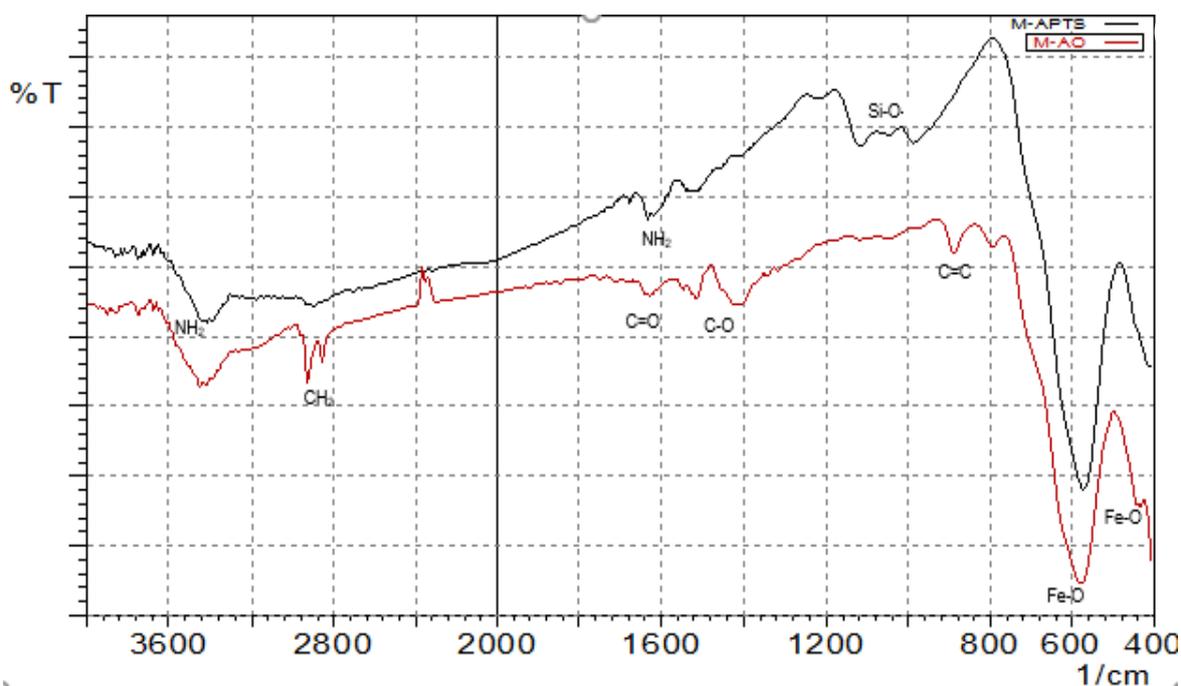


Figura 21 - Espectros de FTIV das M-AO e M-APTS.

Durante a preparação das nanomagnetita pelo método da co-precipitação química em ambiente aquoso, as superfícies são revestidas por grupos hidroxila, as bandas características desse grupo (-OH), aproximadamente 1600 cm^{-1} e 3420 cm^{-1} , aparecem no espectro FTIR (Rocha, 2016). Já a banda presente em ambos espectros em aproximadamente 2360 cm^{-1} é atribuída ao CO_2 da atmosfera no momento da análise.

As nanopartículas recobertas com AO, apresentaram pico de absorção em aproximadamente 2921 cm^{-1} e 2850 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento assimétrico CH_2 e ao simétrico CH_2 . Aparecem duas bandas de deformação axial em 1.416 e 1.315 referente ao ácido carboxílico, devido ao acoplamento da deformação angular no plano da ligação O-H e à deformação axial de C-O e em 1628 cm^{-1} devido ao estiramento do C=O. A banda 886 é referente à ligação C=C (Solomons e Fryhle, 2012).

A análise das bandas da M-APTS indicou em torno de 1530 e 1631 cm^{-1} referente à deformação angular simétrica do NH_2 e uma banda fraca em 3400 cm^{-1} uma deformação axial do NH de amins secundárias que coincide com a banda do O-H. As bandas em torno de 1050 e 990 cm^{-1} e que correspondem ao estiramento assimétrico Si-O proveniente da modificação da superfície com agente silano (Pingarrón et al, 2012 e Fessenden e Fessenden, 1982).

4.3 – Caracterização por Difração de Raio-X

A caracterização das nanopartículas magnéticas e dos suportes magnéticos porosos foi feita para verificar a formação da fase cristalina da magnetita. Nos difratogramas da Figura 22, observa-se o perfil de difração de raios-X das amostras.

Os picos identificados no difratograma foram os referentes aos índices (111), (220), (311), (222), (400), (422), (511), (440), (620), (533) e (662). Eles são compatíveis com a ficha JCPDF (Powder Diffraction File) 19-0629, referente à magnetita ou maghemita e revelam uma estrutura cristalina do tipo espinélio invertido, com rede de Bravais cúbica de face centrada. Os picos são intensos e estreitos, o que indica que a magnetita apresenta alta cristalinidade.

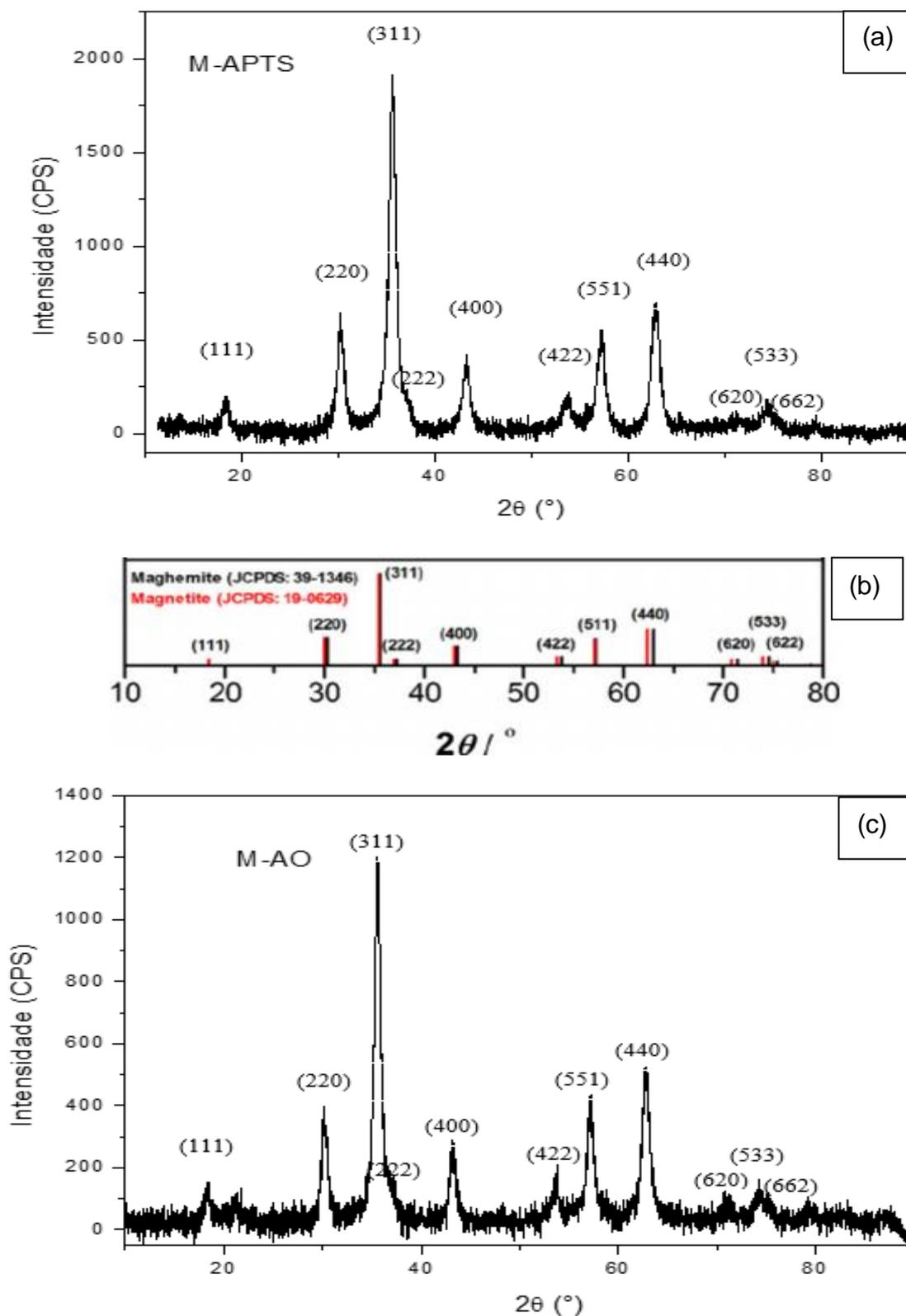


Figura 22 - Difratoograma de raio-X da amostra M-APTS em (a) e M-AO em (c), e a ficha padrão de Magnetita e Maghemita, JCPDS 19-0629, em (b).

Com a análise do difratograma foi possível confirmar a formação da fase Fe_2O_3 que pode ser atribuída tanto à magnetita como maghemita, já que em ambas estruturas cristalinas as fases apresentam picos de Bragg praticamente na mesma posição. A confirmação de qual dos óxidos magnéticos formado foi pela análise de Mössbauer (Item 4.4). A análise descartou a presença de outros óxidos de ferro, como goetita e hematita, e também não apresentou picos que pudessem ser atribuídos a impurezas.

Através da Equação de Scherrer ($D = K\lambda/\beta\cos\theta$), utilizando o pico mais intenso (Figura 22) calculou-se o tamanho médio dos cristais da magnetita, sendo ele 11,78 nm para M-AO e 9,95 nm para o APTS, valores próximos aos estimados no MET, de 12,7 nm e 10,9 nm, respectivamente. Este tamanho se encontra na faixa de 5 a 20 nm característico de monodomínios os quais devem apresentar um comportamento superparamagnético a ser avaliado na análise de VSM (Item 4.5).

Apesar do cálculo do tamanho médio do cristal através da Equação de Scherrer não ser suficiente para caracterizar o tamanho de todas as partículas incluindo as amorfas, é uma evidencia necessária na caracterização da magnetita sintetizada conjuntamente com o realizado pela MET e está de acordo com os reportes de Goya et al. (2003), Li, G. et al. (2008) e Silva, V.A.J. et al. (2013).

4.4 – Determinação das Fases de Ferro por Espectroscopia Mössbauer

Na Figura 23 observa-se o espectro obtido para as amostras M-AO e M-APTS. Acima da transição de Verwey, ~ 122 K, Fe_3O_4 apresenta uma estrutura cubica do tipo espinel inversa e duas componentes $(\text{Fe}^{3+})_A$ e $(\text{Fe}^{3+}\text{Fe}^{2+})_B$, sítios A (Tetraedral) e B (octaedral) respectivamente. Na Figura a linha de cor azul corresponde ao sítio A e a linha de cor vermelha ao sítio B.

A linha verde corresponde a uma distribuição de campos magnéticos hiperfinos provavelmente devido a uma distribuição de tamanho de partículas em escala nanométrica as que não se encontram bloqueadas magneticamente a

temperatura ambiente. Mas não são suficientemente pequenas para apresentar um dubleto característico de um estado superparamagnético (Gomes *et. al.*, 1999).

O ajuste para os espectros a temperatura ambiente das duas amostras (M-AO e M-APTS) foram obtidos utilizando dois sítios magnéticos com uma distribuição de campos magnéticos hiperfinos. Os parâmetros hiperfinos obtidos, mostrados na Tabela 3, sugerem que ambas as amostras são de magnetita. Não foi evidenciado a presença de fases espúrias.

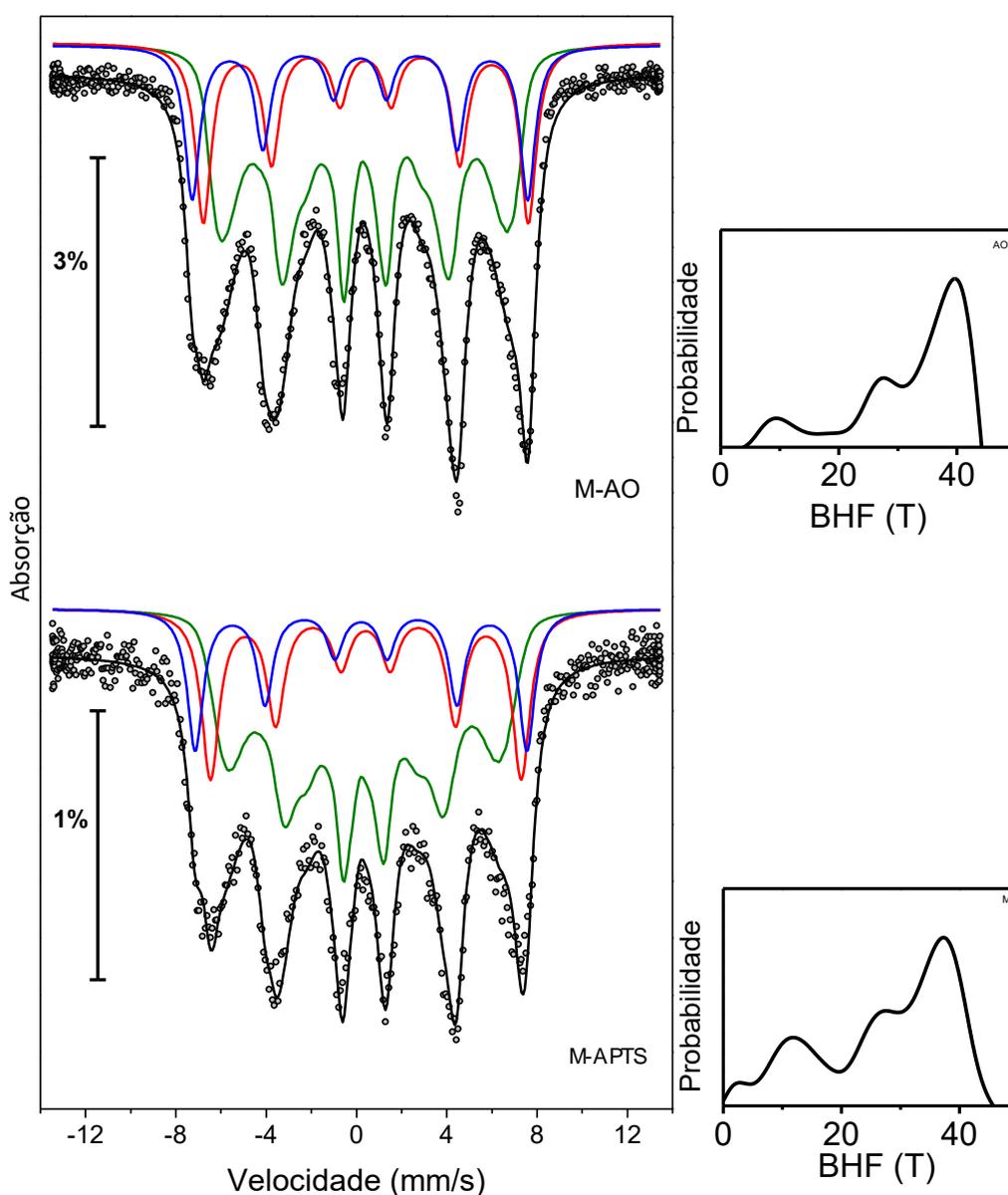


Figura 23 - Espectro Mössbauer das amostras M-AO e M-APTS.

Como não houve a formação de dubletos, não se podem afirmar as características superparamagnéticas da magnetita por esta análise. Pode-se inferir que ainda estavam presentes multidomínios na amostra. No entanto, a formação dos sextetos indica a presença de monodomínios, porém sem uma redução total do tamanho capaz de ocasionar uma transição de fase magnética (Moreto et al., 2008; Goya et al., 2003).

Tabela 3 - Parâmetros Obtidos no Espectro de Mössbauer

Sub-espectros	Parâmetros	M-AO	M-APTS
Sitio A	ISO (mm/s)	0.37 (1)	0.31 (2)
	QUA (mm/s)	0.02 (1)	0.01(1)
	BHF (T)	46.8 (1)	45.6 (7)
	ARE (%)	19 (2)	28 (2)
Sitio B	ISO (mm/s)	0.51 (2)	0.52 (1)
	QUA (mm/s)	0.01 (1)	0.02 (2)
	BHF (T)	46.4 (1)	42.7 (2)
	ARE (%)	23 (2)	24 (2)
Distribuição	<ISSO> (mm/s)	0.43 (4)	0.36 (6)
	QUA (mm/s)	0.01	0.01
	<BHF> (T)	34.3 (1)	30.3(2)
	ARE	58(2)	58(2)

Os campos magnéticos menores aos reportados na literatura, 49,1 T para o sítio A e 46 T para sítio B (Vandenberghe, 1991), para a magnetita podem ser devido ao tamanho das nanopartículas e devido também ao recobrimento por AO o APTS (para isto deveria ter sido medido a magnetita sem AO e APTS). A presença do sítio do Fe^{+2} e o valor dos campos hiperfinos inferiores a 50 T descartam a hipótese de a amostra ser maghemita.

A temperatura ambiente se toda a amostra fosse do mesmo tamanho (bulk) haveria apenas dois sítios A e B com os campos de 49 T e 46 T. Mas além das partículas maiores, com comportamento magnético comparáveis ao Bulk, há partículas menores, mas não pequenas suficientes para apresentar o espectro

superparamagnético que seria um dubleto. Essas partículas menores ainda apresentam um comportamento magnético com campos magnéticos hiperfinos de diversos valores (menores aos do bulk) devido à distribuição do tamanho de partícula (Moreto, 2007). Estes igualmente apresentam sítio A e sítio B mas como são diversos valores de campos fica difícil identifica-los, então a distribuição representa vários valores de campo tanto nos sítios A e B.

4.5 - Análise Térmica (TG) dos Suportes Modificados

As Figuras 24-25 apresentam as curvas de TGA dos suportes modificados.

O termograma da magnetita modificada com APTS (M-APTS) apresenta uma perda de 3% em massa que pode ser atribuída a água que está associada aos grupos terminais (-NH₂) do APTS. A temperaturas superiores se observa uma perda de massa do “braço” orgânico do aminosilano seguido, a temperatura acima de 600°C, da transformação em óxido de silício.

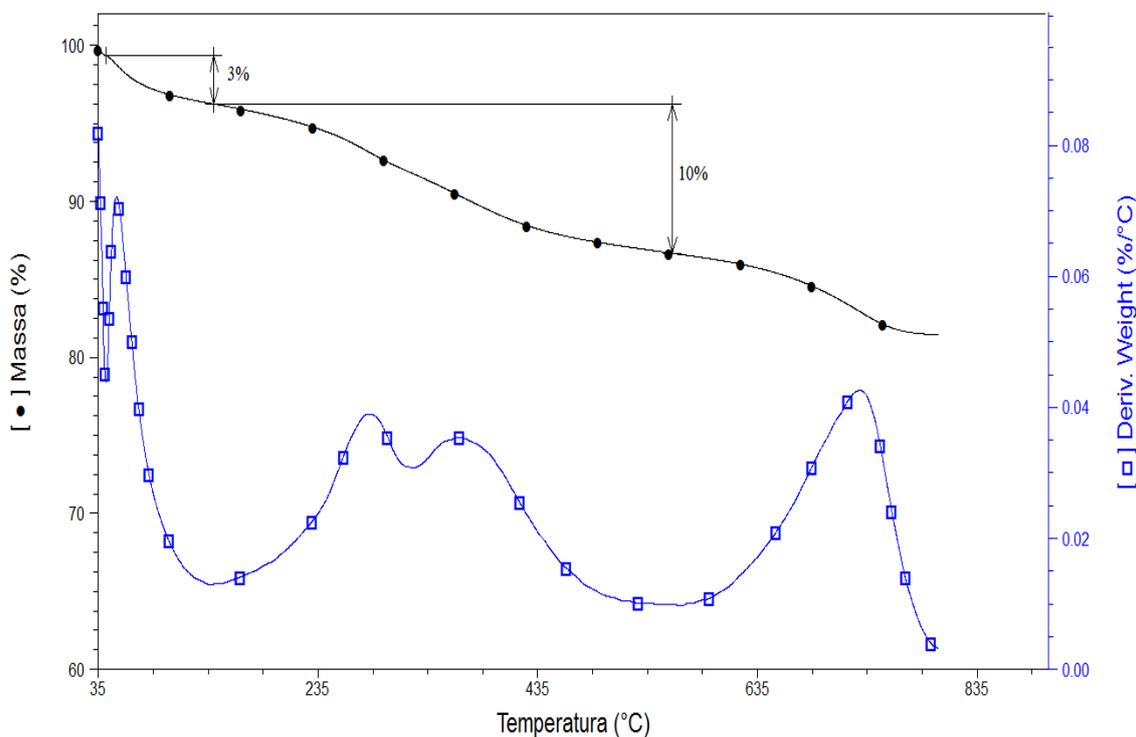


Figura 24 - Curvas termogravimétricas dos suportes M-APTS.

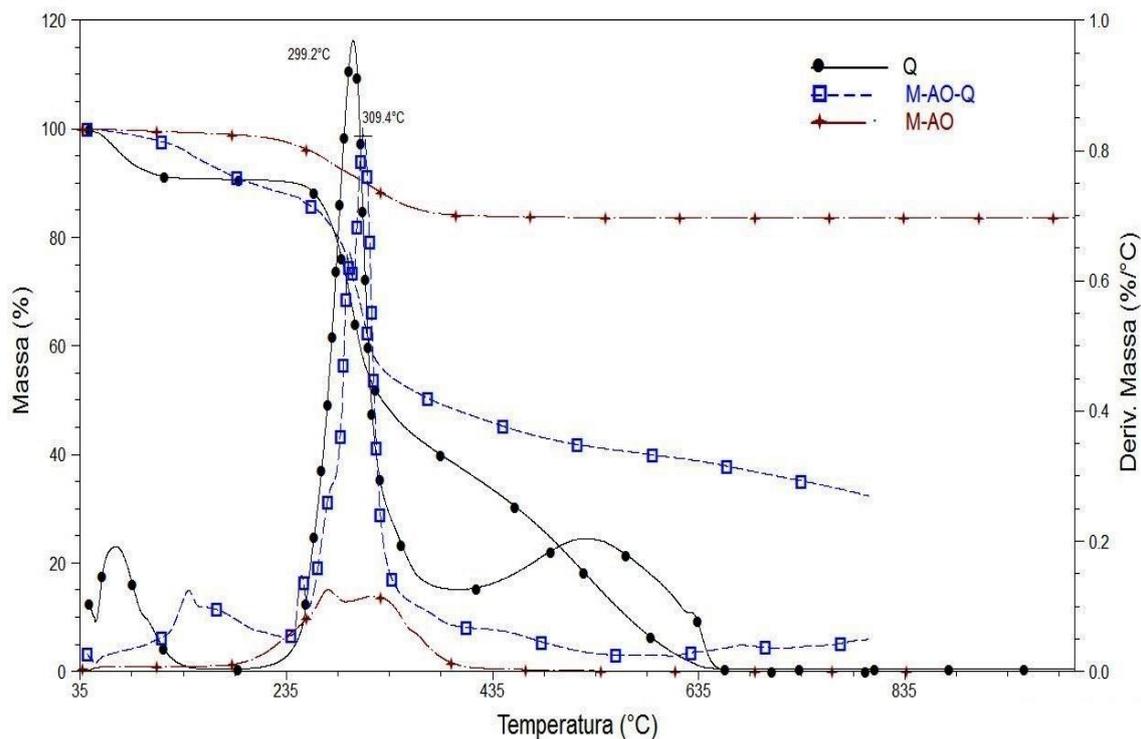


Figura 25 - Curvas termogravimétricas dos suportes M-AO-Q.

A modificação realizada com quitosana após tratamento com ácido oleico da superfície da magnetita origina uma discreta estabilização da quitosana suportada, como pode ser observado no deslocamento da taxa de máxima degradação na curva DTG associada à degradação térmica da quitosana.

Em geral, o comportamento térmico observado nos suportes evidencia a modificação pretendida da magnetita.

4.6 – Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das Microesferas

A morfologia das micropartículas contendo o núcleo magnético (Figura 26) foi investigada com o auxílio das técnicas de microscopia ótica e microscopia eletrônica de varredura (MEV).

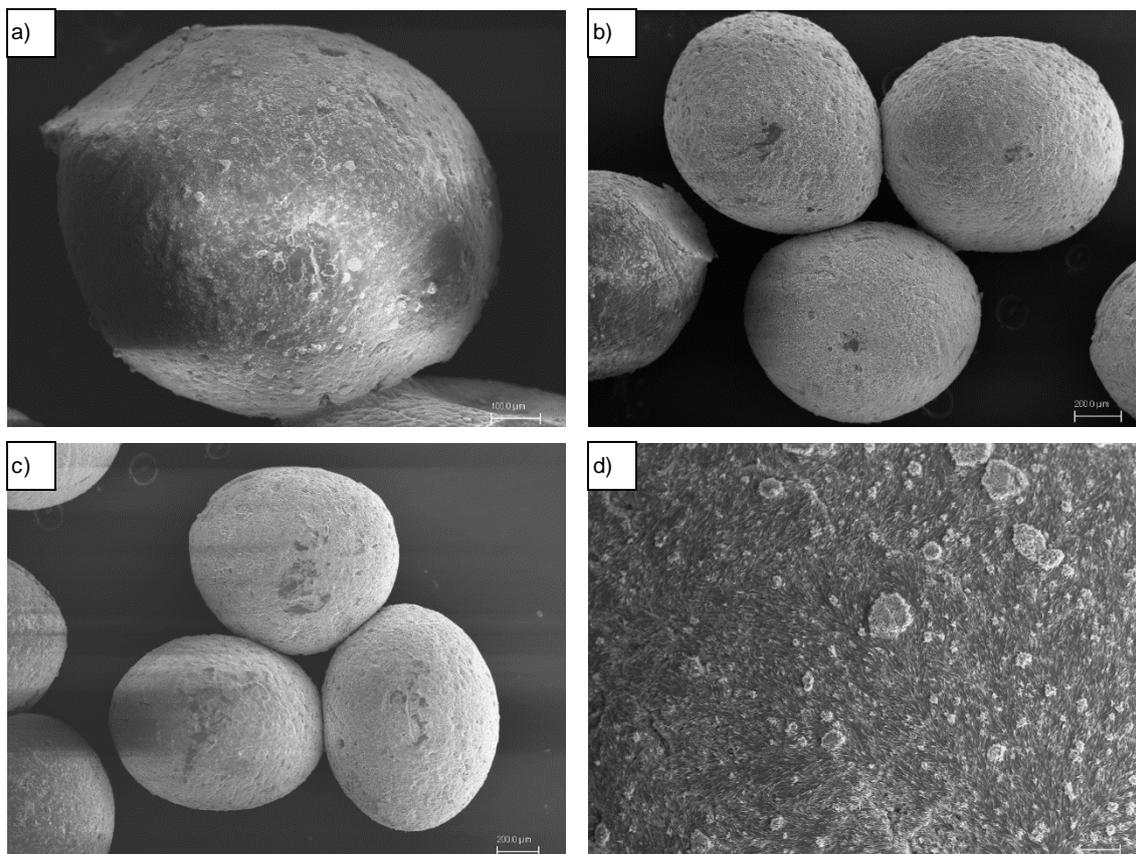


Figura 26 – Micrografia eletrônica de varredura das microesferas magnéticas em (a, b e c) e a parede da microesfera (d).

As micropartículas têm um formato regular esférico (figura 26 a) e uma distribuição de tamanho relativamente estreito (figura 26 b e c). A morfologia superficial das micropartículas (figura 26 d) de quitosana preparada pela técnica de coagulação não apresenta irregularidades nem macroporosidade. Suportes não porosos apresentam como principal vantagem a acomodação das moléculas de enzima apenas na sua superfície externa, o que facilita a interação do catalisador com o substrato (Canilha *et. al.*, 2006).

O gráfico na Figura 26 apresentam uma estimativa de tamanho médio das partículas com 50 medidas feitas nas micrografias obtidas no MEV. As microesferas apresentaram uma faixa de distribuição de tamanho de 785 a 1055 μm com 31% das micropartículas com diâmetro entre 935 e 965 μm (Tabela 6).

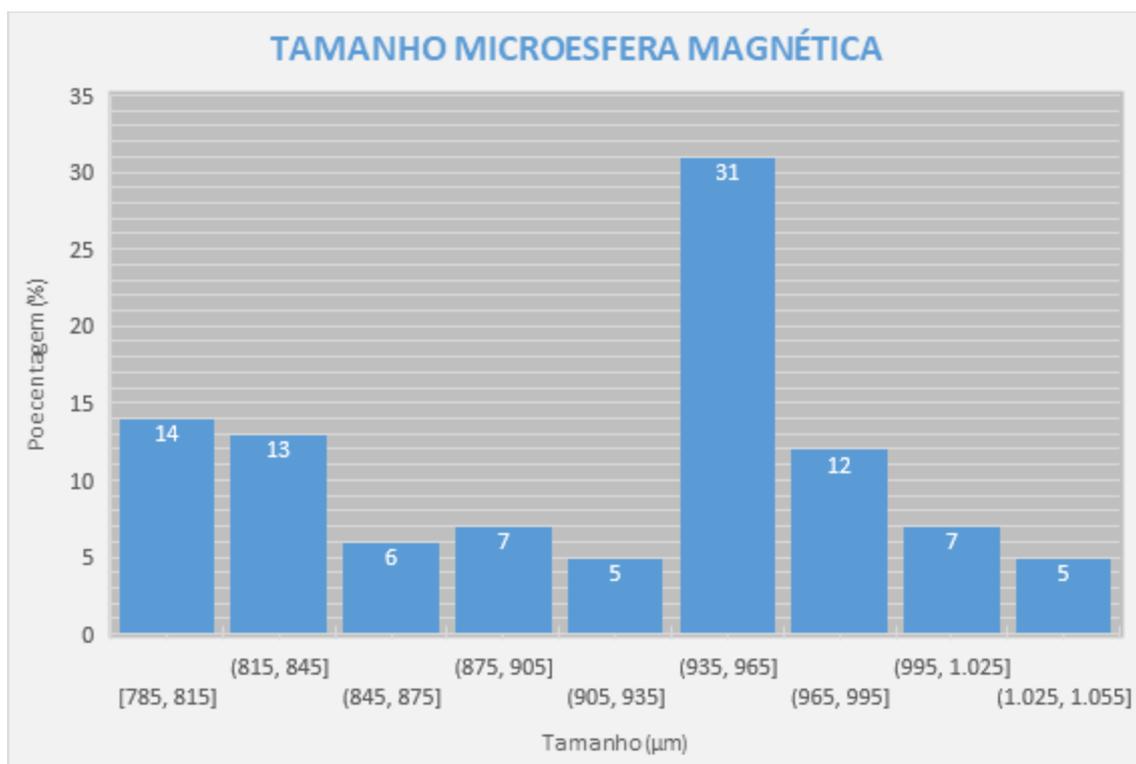


Figura 27- Gráfico da distribuição das microesferas magnéticas.

4.7 – Magnetometria de Amostra Vibrantes (VSM)

As Figuras 28 e 29 apresentam as medidas de magnetização das nano magnetitas modificadas, a análise foi realizada para caracterizar o comportamento magnético das amostras.

A magnetização de saturação da M-AO foi de 62,8 emu/g e da M-APTS 63,1 emu/g. A literatura reporta valores entre 50 e 70 emu/g para nanopartículas de magnetita (Castanharo et. al., 2012 e Lee et. al., 2009), outros autores relatam que valores de saturação bem inferiores, de 8 a 30 emu/g, precisam de um campo magnético maior gerando um maior custo para operar em reatores de leito fluidizado (Li et. al., 2009; Souza, 2006; Costa et. al., 2012).

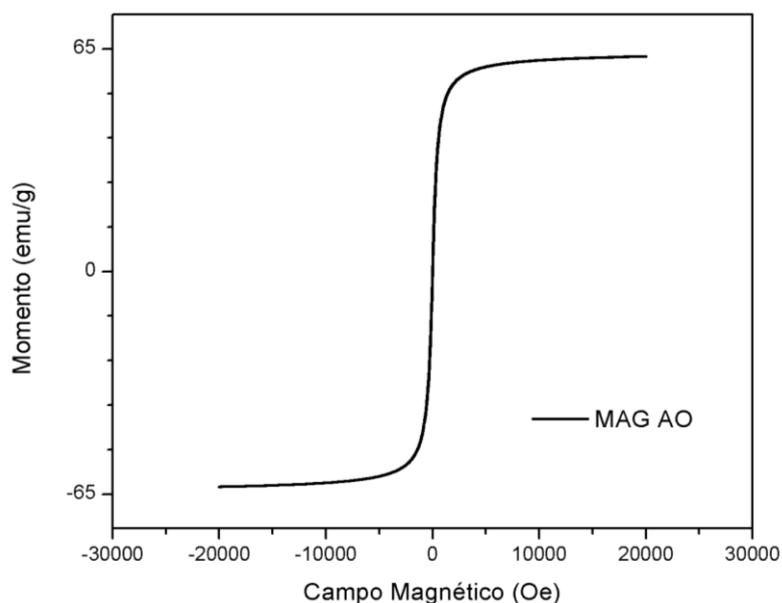


Figura 28 - Curva de magnetização das micropartículas de M-AO.

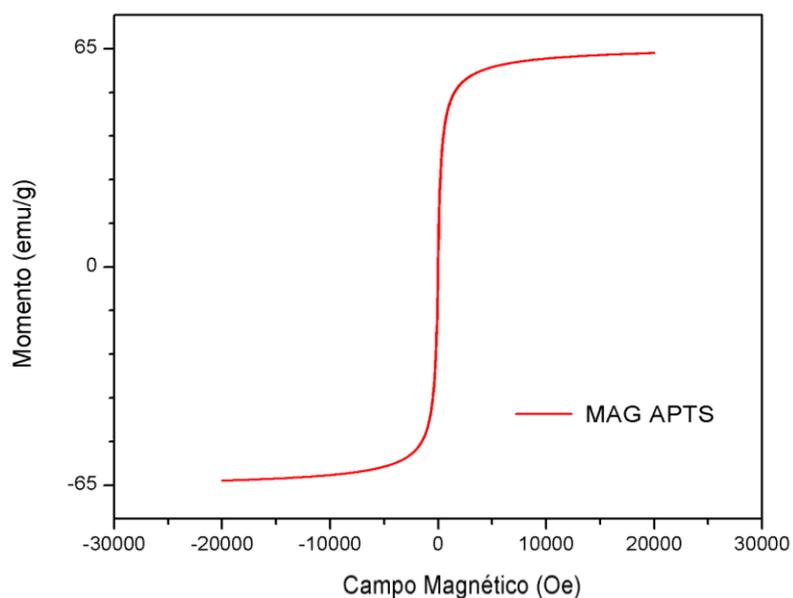


Figura 29 - Curva de magnetização das micropartículas de M-APTS.

A curva de magnetização não apresentou histerese, assim não há magnetização permanente ou indução residual caracterizando um comportamento superparamagnético (Bouças, 2008). A ausência de histerese evidencia uma baixa coercividade e uma reversibilidade elevada, ou seja, a influência dos campos magnéticos gerou uma resposta rápida e no momento em que o campo é retirado o magnetismo cessa. Se a magnetização não cessar,

após a retirada do campo, as micropartículas podem permanecer aglomeradas, dificultando o seu processo de regeneração (Costa et. al., 2012).

Estes comportamentos superparamagnéticos observados nas NPM e a elevada magnetização de saturação são importantes pela possibilidade de controle da distribuição das partículas magnéticas dentro do reator de leito fluidizado assistido, possibilidades de operar no reator com fluxos maiores e fácil recuperação do biocatalisador (Xie et al., 2012).

4.8 - Avaliação da Ativação com Glutaraldeído por FTIR

As figuras 30 e 31 ilustram os espectros de transmissão na região do infravermelho realizadas para as amostras dos suportes magnéticos ativados e dos suportes magnéticos ativados e imobilizado.

Nos espectrogramas foi analisada a modificação originada pela ativação dos suportes M-AO-Q e M-ATPS com o glutaraldeído através do nitrogênio nucleofílico do grupo amino ($-NH_2$) da quitosana e do APTS, os quais devem reagir com o grupo carboxila do aldeído, originando uma imina e a perda de uma molécula de água formando assim a ligação $C=N$ com sinais entre $1650 - 1750cm^{-1}$ assim como um sinal entre $1600 - 1650cm^{-1}$ associada a ligação amina, $-NH_2$, (Mansur et. al, 2008).

Na figura 30 observa-se na curva de M-ATPS-GA E M-ATPS-GA-Lipase o aparecimento da banda referente ao $C=N$ (~ 1660) que em relação de intensidade entre esse sinal com o agrupamento $-SiO$ (~ 1200) ($I_{SiO}/I_{C=N}$) que não sofre modificação é de 0,987 e 0,976 respectivamente. Essa diminuição na relação, mostra que a concentração de $C=N$ aumentou no suporte imobilizado que era esperado já que no M-ATPS-GA-Lipase o glutaraldeído se liga a dois grupos aminos, o do APTS e o da enzima.

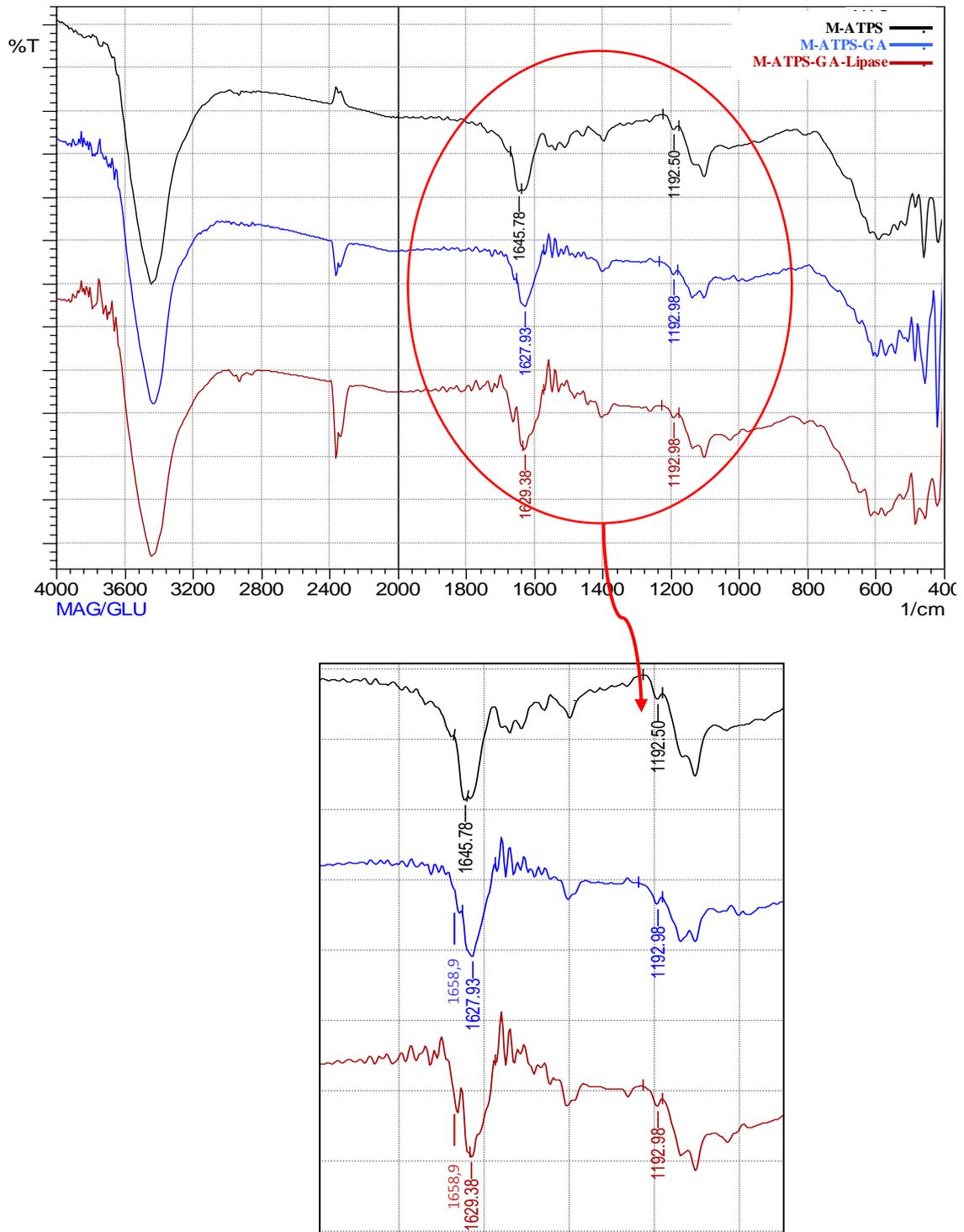


Figura 30 - Espectros de FTIV dos M-APTS, M-ATPS-GA e M-ATPS-GA-Lipase.

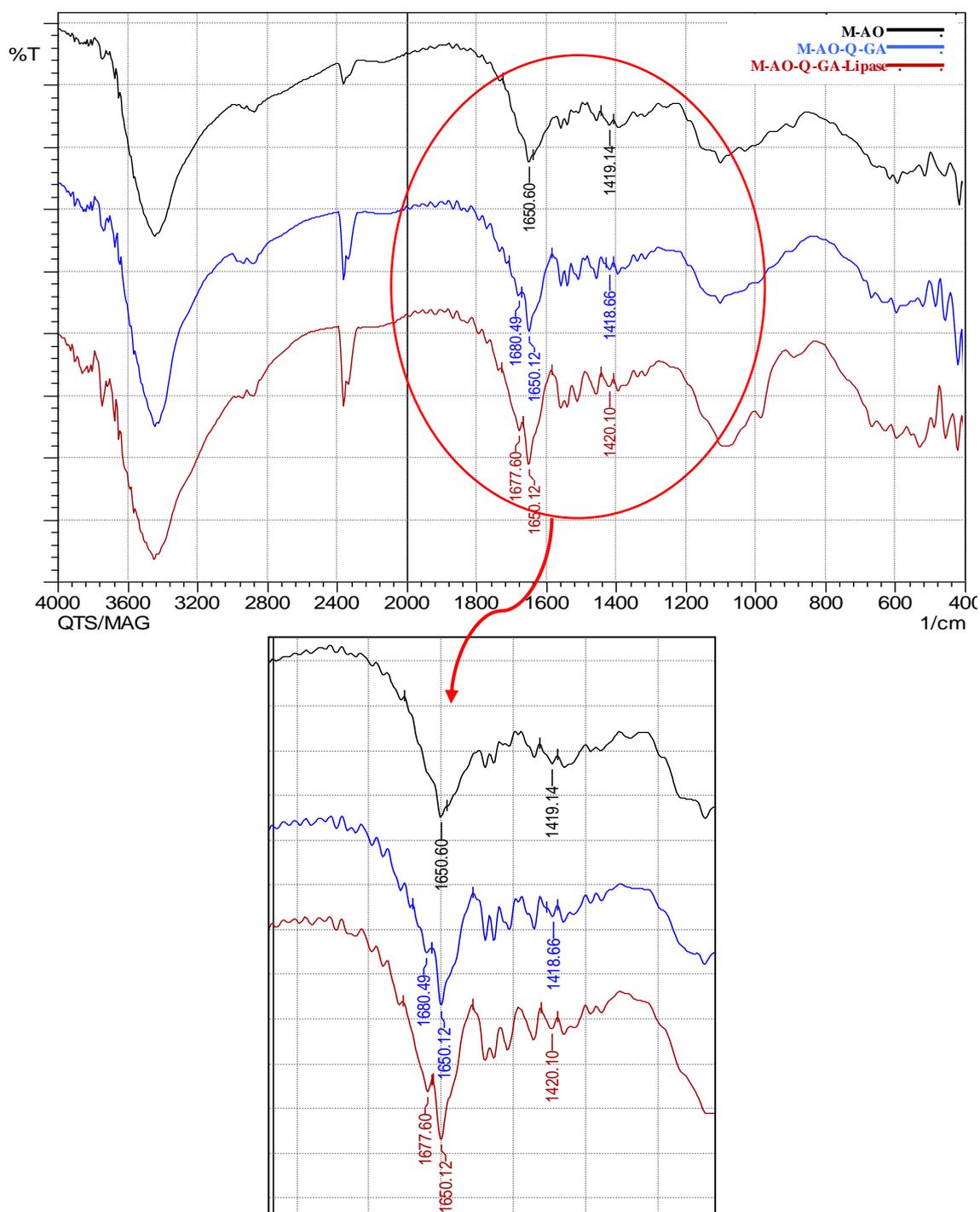


Figura 31 - Espectros de FTIV dos M-AO-Q, M-AO-Q-GA e M-AO-Q-GA-Lipase.

Na Figura 31 observa-se comportamento semelhante à Figura 30 com aparecimento da banda referente ao C=N (~1680) com a relação de intensidade entre esse sinal de deformação angular do agrupamento $-\text{CH}_2$ adjacente a carbonila, presente na estrutura da quitosana (~1420) ($I_{\text{CH}_2}/I_{\text{C=N}}$) e que não sofre

modificação é de 0,978 e 0,962 para os suportes M-AO-Q-GA e M-AO-Q-GA-Lipase, respectivamente, com a presença do aumento de C=N pelo mesmo motivo que no suporte M-APTS quando imobilizado.

4.9 – Determinação de Proteína

A análise da atividade enzimática após imobilização da lipase AK em superfícies que apresentam diferentes ambientes químicos foi realizada tendo como base a metodologia segundo Mendes (2009) e Cetinus *et. al.* (2007). Para os cálculos de atividades foi necessário saber as massas de proteína presente nas soluções enzimáticas.

A metodologia empregada para determinar a concentração de proteínas foi o método Bradford. Uma solução de Lipase (5 mg/mL) em solução tampão foi analisada. Tal solução foi a utilizada para imobilizar os suportes.

Utilizando este mesmo método determinaram-se as concentrações depois de realizado o processo de imobilização nas soluções de partida usadas na imobilização do M-ATPS-GA e M-AO-q-GA.

Pode ser observada na Tabela 4 a porcentagem de enzimas imobilizadas, calculada subtraindo a concentração após imobilização da solução de partida do valor da concentração da solução de enzima livre (Eq2).

Tabela 4 – Concentrações relativas de soluções enzimáticas.

Amostra	Enzima Imobilizada (mg/mL)
Partida de M-ATPS-GA	(61%)
Partida de M-AO-Q-GA	(23%)

Por esse resultado é possível uma comparação que mostra que a imobilização na M-AO-Q-GA é menos eficiente, M-APTS-GA teve 2,7x mais enzima imobilizada no suporte. Os parâmetros, como concentração, temperatura, tempo, utilizados na ativação com glutaraldeído, ou as condições de imobilização não são os ideais.

4.10 – Determinação da Atividade Relativa

A estratégia utilizada para avaliar a atividade da lipase imobilizada nos diferentes suportes utilizados se baseia no método de hidrólise do azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de Castro *et al.*, 2010. Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH, utilizando fenolftaleína como indicador. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima que libera em 1 μmol de ácido graxo por minuto de reação.

Os resultados encontrados (Tabela 5) mostram a comparação entre o valor de atividade da enzima livre com a imobilizada, chamada de atividade relativa.

Tabela 5 - Valores da atividade hidrolítica dos suportes imobilizados.

Suporte/Lipase AK	Atividade Relativa %
M-APTS-GA	84,6
M-AO-Q-GA	46,3

Apesar dos derivados imobilizados terem apresentado menor valor de atividade hidrolítica, em relação à lipase livre, deve-se lembrar as vantagens do uso da enzima imobilizada no suporte magnético, como o aumento da estabilidade da enzima e a possibilidade de reuso do biocatalisador (Rocha, 2016).

Silva, 2009, reportou uma atividade relativa de 25,3% num suporte de matriz híbrida constituída de polissiloxano-álcool polivinílico (POS-PVA) imobilizada com Lipase AK.

Rocha, 2016, obteve 31,34% de atividade relativa de lipase pancreática de porco imobilizada num suporte de magnetita modificado com APTS.

Tintor, 2014, obteve para lipase AK se oferecido 200 mg de enzima por g de suporte, como feito na metodologia seguida por esse estudo, 91% de atividade relativa.

Mijone, 2014, reportou uma atividade relativa de 80,5% da lipase de *Burkholderia cepacia* ligadas covalentemente em partículas de magnetita e maghemita ativadas.

5 – CONCLUSÕES

A síntese da nanomagnetita com a metodologia de co-precipitação foi constatada pelas técnicas de Difração Raio-X e pelos sextetos característicos do efeito Mössbauer e valores dos campos hiperfinos.

O ajuste da metodologia de co-precipitação permitiu obter, como pretendido, partículas de magnetita em torno de 14 nm para nanomagnetita modificada com ácido oleico e 12 nm para modificada com APTS, a faixa dos monodomínios foi comprovado com auxílio das técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figuras 17 a 19) e Difração de raios X (Figura 22).

As nanopartículas foram convenientemente desagregadas como o tratamento realizado com ácido oleico como observado nas imagens de MET. O recobrimento efetivo foi constatado a partir dos resultados de infravermelho no qual se observaram os sinais a 1690 cm^{-1} , devido ao C=O do grupo carboxílico na superfície das magnetitas tratadas.

As microesferas de quitosana com nanomagnetitas modificadas com ácido oleico têm um formato regular esférico (Figura 26) e uma distribuição de tamanho estreito com 31% das esferas com diâmetro entre 935 e 965 μm .

A modificação com APTS resultou em uma desagregação efetiva como registrado nas imagens de MET. Na análise FTIV onde é observada as bandas em torno de 1050 e 990 cm^{-1} correspondem ao estiramento assimétrico Si-O provam a modificação da superfície com o agente silano.

O comportamento magnético da magnetita foi registrado a partir das curvas de susceptibilidade magnética as quais não apresentaram histerese e nem magnetização permanente ou indução residual caracterizando um comportamento superparamagnético com uma magnetização de saturação máxima entorno de 63 emu/g apropriado para uso em reatores assistidos por campos magnéticos externos.

Os suportes enzimáticos com características modificadas e utilização de braços extensores que torna a enzima com menores restrições conformacionais, mostram uma satisfatória imobilização e boa atividade relativa de 85% para M-ATPS e 46% para M-AO-Q.

6 – REFERÊNCIAS

ABAZINGE M.D.A., FONTENOT J.P., ALLEN V.G., FLICK G.J. Ensiling Characteristics of Crab Waste and Wheat Straw Treated with Different Additives, **J. Agriculture Food Chemistry**, v 41, 1993, p 657

AGUIAR, R. O.; MONDARDO, R. M.; AGNES, E. J.; CASTRO, H. F.; PEREIRA, E. B. "Evaluation and comparison of the efficiency of detention in chitosan pancreatic lipase for production of fatty acids in flasks under shaking." *Acta Scientiarum. Technology*, v. 32, n. 1, 2010, p. 15.

AKBARZADEH A.; SAMIEI, M.; DAVARAN, S. Magnetic Nanoparticles: Preparation, Physical Properties, And Applications in Biomedicine. **Nanoscale Research Letters**, V. 7, 2012, p. 144.

ALVES A. C., CARDOSO, J. F., ALMEIDA, M. A. P., MELO, C. K., LOUZEIRO, H. C. Reaproveitamento De Lipase Imobilizada na Transesterificação Do Óleo De Babaçu. **Biodiesel O Novo Combustível Do Brasil**, 2005, p. 85.

ALVES A. M. R. **Desenvolvimento de nanopartículas magnéticas para tratamento de cancro: estudo da síntese e estabilização das soluções coloidais de Fe₃O₄**. Dissertação (Mestrado), Universidade Nova de Lisboa. 87f. Lisboa, 2012.

AQUINO, R.; TOURINHO, F. A.; ITRI, R.; LARA, M. C. F. L. e; DEPEYROT, J. Size control of MnFe₂O₄ nanoparticles in electric double layered magnetic fluid synthesis. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, 2002, p. 23.

ARAUJO L. T. C. **Aplicações de Lipases**. Dissertação (mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 64f, 2009.

ARRUEBO M., FERNÁNDEZ-PACHECO R., IBARRA M. R., SANTAMARÍA J. Magnetic Nanoparticles For Drug Delivery. **Nano Today**, V. 2, 2002, p. 22.

ATACAN K., ÖZACAR M. Characterization and Immobilization of Trypsin On Tannic Acid Modified Fe₃O₄ Nanoparticles. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, 2015, p. 1.

AZEVEDO V. V. C., CHAVES S. A., BEZERRA D. C., LIA FOOK M. V., COSTA A. C. F. M. Quitina E Quitosana: Aplicações Como Biomateriais. **Revista Eletrônica De Materiais E Processos**, Campina Grande, V.23, 2007, p. 27.

BAJAJ, A.; LOHAN, P.; JHA, P. N.; MEHROTRA, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, 2010, p. 9.

BARBOSA A. S., SILVA M. A. O., CARVALHO N. B., MATTEDI S., IGLESIAS M. BERGAMASCO R., BASSETTI F.J., MORAES F., ZANIN G. M. Characterization of Free and Immobilized Invertase Regarding Activity and Energy of Activation. **Brazil Journal Chemical Engineering**, V.17, 2000, p. 4.

BERGER J., REIST M., MAYER J. M., FELT O., PEPPAS N. A., GURNY R., EUR J. Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. **Pharm. Biopharm.** V 57, 2004, p. 19.

BICKERSTAFF G. F. Immobilization of enzyme and cells. In: Schmauder, H.P. (Ed.) **Methods in biotechnology**, Totowa: Humana Press. 1997, p.367.

BODIESEL STANDARD; Resolução ANP nº 7, **Diário Oficial da União**, Brasil, 2008.

BÔA MORTE, E. F. **Formulação de Microcápsulas com Propriedades Magnéticas a Partir de Polímeros Naturais**. Tese de Conclusão de Curso (Bacharelado) –Universidade Estadual Do Norte Fluminense – UENF. Campos Dos Goytacazes – RJ, 2014

BON E.P.S., FERRARA M.A., CORVO M.L., **Enzimas Em Biotecnologia – Produção, Aplicações E Mercado**. Ed. Interciência, 2008, 506p

BOUÇAS, T. A. O. **Efeito de alguns parâmetros de síntese na obtenção de copolímeros à base de estireno e divinilbenzeno com propriedades magnéticas**. Dissertação (Mestrado), Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ. 61p. Rio de Janeiro, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein-drye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, 1976, p. 248.

BRUSCHI M. L., CARDOSO M. L. C., LUCCHESI M. B., GREMIÃO M. P. D. Gelatin Microparticles Containing Propolis Obtained by Spray -Drying Technique: Preparation and Characterization. **International Journal Of Pharmaceutics**, V. 264, 2003, p.45.

CANAKCI, M. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. **Bioresour. Technol.**, v 98, 2007, p. 183.

CANILHA L., CARVALHO W., SILVA J. B. A. Biocatalisadores Imobilizados: Uso De Células E Enzimas Imobilizadas Em Processos Biotecnológicos. **Biotecnologia Ciência E Desenvolvimento**, V. 9, 2006, p.48.

CARVALHO, E. A. S. **Formulação E Caracterização De Biocatalisadores Com Núcleo Magnético A Partir De Polímeros Naturais**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Do Norte Fluminense – UENF. 122p. Campos Dos Goytacazes – RJ, 2012.

CASTANHARO, J. A., MELLO, I. L., MARIA, L. C. S., COSTA, M. A. S., SILVA, M. R., OLIVEIRA, M. G. Preparação e Caracterização de microesferas poliméricas magnéticas à base de estireno,divinilbenzeno e acetato de vinila. **Revista Polímeros Ciência e Tecnologia**, v.XXII, n.3, 2012, p.303.

CASTRO H. F., SANTOS J. C., MENDES A. A., SILVA G. A. M., RÓS P. C. M. R. Evaluation of The Catalytic Properties of Burkholderia Cepacia Lipase Immobilized On Non-Commercial Matrices to Be Used in Biodiesel Synthesis from Different Feedstocks. **Bioresource Technology**, V 101, 2010, p. 5508.

CASTRO H. F., ZANIN G. M., MORAER de et al. Imobilização de enzimas e sua estabilização. In: BON, E. P. S.; FERRARA, M. A.; CORVO, M. L. **Enzimas em biotecnologia: produção, aplicação e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. Cap. 6, p. 123.

COMERLATO, M. H. **Imobilização De Enzimas No Suporte Crisólita**. Tese (Doutorado), Universidade Estadual De Campinas – UNICAMP. 99p. Campinas, 1995.

CONTI, R., RODRIGUES J. P. R., MORAN, P. J. Biocatálise: Avanços Recentes. **Química Nova**, v.5, 2001, p.672.

COSTA C. N., COSTA M. A. S., MARIA L. C. S., SILVA M. R., SOUZA F. G., MICHEL, R. Síntese e caracterização de copolímeros à base de metacrilato de metila e divinilbenzeno com propriedades magnéticas. **Revista Polímeros Ciência e Tecnologia**, v. 22, n.3, 2012, p.260.

COSTA NETO P. R., ROSSI L. F. S., ZAGONEL G. F., RAMOS L. P. Produção De Biocombustíveis Alternativo Ao Óleo Diesel Através Da Transesterificação De Óleo De Soja Usado Em Frituras. **Química Nova**, V. 23, 2000, p. 531.

CRUZ J. A., PACHECO S. M. V., FURIGO J. A. Imobilização De Lipase De Cândida Antarctica B Em Esferas De Quitosana Para Obtenção De Biodiesel Por Transesterificação De Óleo De Mamona. **Anais Congresso Brasileiro De Biodiesel**. Florianópolis. 2007.

CULLITY B. D., GRAHAM C. D. **Introduction to Magnetic Materials**. 2.Ed. Notre Dame, Indiana: Wiley E Sons, 2009.

DALLA-VECCHIA R., NASCIMENTO M. G., SOLDI V. Aplicações Sintéticas De Lipases Imobilizadas Em Polímeros. **Química Nova**, V. 27, 2004, p. 623.

DEBRASSI, A. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de derivados da quitosana para aplicação como sistemas de liberação de indometacina**. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Vale do Itajaí – UNIVALI, 129p. Itajai, 2011.

DEMIRBAS, A. Importance of Biodiesel as Transportation Fuel. **Energy Police**. V 35, 2007, p. 4661.

DENG, L.; XU, X.; HARALDSSON, G. G.; TAN, T.; WANG, F. Enzymatic production of alkyl esters through alcoholysis: A critical evaluation of lipases and alcohols. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 82, n. 5, 2005, p. 341.

DENKBAS E. B., KILIC E., BIRLIKSEVEN C., OZTURK E. Magnetic Chitosan Microspheres: Preparation and Characterization. **Reactive & Functional Polymers** V 50, 2002, p. 225.

DIAS F. S., QUEIROZ D. C., NASCIMENTO R. F., LIMA M. B. Um sistema simples para produção de microesferas de quitosana. **Química Nova**, V 31(1), 2008, p. 160.

DUARTE F., TOBOUTI P.L., HOFFMAN D. **Produção Enzimática De Biodiesel**. Universidade Federal De Santa Catarina - UFSC. Santa Catarina, 2006.

DURÁN N., MATOSO L. H., MORAIS P. C. **Nanotecnologia, Introdução, Preparação E Caracterização De Nanomateriais E Exemplos De Aplicação.** Artibler Editora, 2006.

EWIJK, G. A.; VROEGE, G. J.; PHILIPSE, A. P.; Convenient preparation methods for magnetic colloids. **J. Magn. Magn. Mater.** v. 201, 1999, p. 31.

FACIOLI N. L., GONÇALVES L. A. G. Modificação Por Via Enzimática Da Composição Triglicéridica Do Óleo De Piqui; **Química Nova**, V 21, 1998, p. 16.

FESSENDEN, R. J., & FESSENDEN, J. S. **Organic chemistry.** Boston, Mass: W. Grant Press, 1982.

FIGUEIREDO L.C., LACAVAA B.M., SKEFF NETO K., PELEGRINI F., MORAIS P.C. Magnetic resonance study of maghemite-based magnetic fluid. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* V 320 (14), 2008, p. 347

FILTVEDT W. O., JAVIDI M., HOULT A., RAMACHANDRAN P. A. Development of Fluidized Bed Reactors for Silicone Production. **Solar Energy Materials And Solar Cells**, V. 94, 2010, p. 1980.

FISCHER, J. **Hidrólise De Lactose Por Beta-Galactosidase De Aspergillus Oryzae Imobilizada Em Reator Leito Fixo.** Dissertação (Mestrado) Faculdade De Engenharia Química, Universidade Federal De Uberlândia, 136p., 2010.

FOMUSO L. B., AKON C. C. Lipase-Catalyzed Acidolysis of Olive Oil and Caprylic Acid in A Bench-Scale Packed Bed Bioreactor. **Food Research International**, v. 35, 2002, p. 15.

FRANZERE M., SIEMANN-HERZBERG M., HOBLEY T. J., THOMAS O. R. T. Protein purification using magnetic adsorbent particles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, 2006, p. 505.

FURIGO A., Salvador A., Ribas C., Maso L., Palharez S. **Biodiesel: Aspectos Gerais E Produção Enzimática**. Universidade Federal De Santa Catarina – UFSC. 27p. Santa Catarina, 2009.

GALVÃO C. M. A. **Hidrólise Controlada De Proteínas Do Soro Láctico Usando Tripsina E Quimotripsina Imobilizadas Em Diferentes Suportes**. Tese (Doutorado). São Carlos, SP. 2004, 191p.

GARCIA-GALAN A., BERENGUER-MURCIA R., FERNANDEZ-LAFUENTE R.C. Potential Of Different Enzyme Immobilization Strategies To Improve Enzyme Performance **Adv. Synth. Catal.**, V 353, 2011, p. 2885.

GAWANDE M. B., RATHI A. K., TUCEK J., SAFAROVA K., BUNDALESKI N., TEODORO O. M. N. D., KVITEK L., VARMA R. S., ZBORIL R. Magnetic Gold Nanocatalyst (Nanocat-Fe–Au): Catalytic Applications for The Oxidative Esterification and Hydrogen Transfer Reactions. **Green Chemistry**, V. 16, 2014, p. 4137.

GERHARTZ, W. General Production Methods. In: **Enzymes in Industry**. New York: VCH Publishers, 1990. p. 67.

GIRELLI A. M., MATTEI E. Application of Immobilized Enzyme Reactor in On-Line High Performance Liquid Chromatography: A Review. **Journal of Chromatography B – Analytical Technologies in The Biomedical and Life Sciences**, V. 819, 2005, p. 316.

GNANAPRAKASH G., MAHADEVAN S., JAYAKUMAR T., KALYANASUNDARAM P., PHILIP J., RAJ B. Effect of initial pH and temperature of iron salt solutions on formation of magnetite nanoparticles. **Mater. Chem. Phys.**, V 103, 2007, p. 168.

GOMES, S., FRANÇOIS, M., ABDELMOULA, M., REFAIT, P., PELLISSIER, C., EVRARD, O. Characterization of magnetite in silico-aluminous fly ash by SEM,

TEM, XRD, magnetic susceptibility, and Mössbauer spectroscopy. **Cement and Concrete Research**, n. 29, 1999, p. 1705

GÓMEZ L, RAMÍREZ H. L., VILLALONGA M. L., HERNÁNDEZ J., VILLALONGA R. Immobilization of Chitosan-Modified Invertase On Alginate-Oated Chitin Support Via Polyelectrolyte Complex Formation. **Enzyme and Microbial Technology**. V 38, 2005, p 22.

GONÇALVES, L. R. B., GIORDANO, R. L. C., RODRIGUES, D. S., MACEDO, G. P., SIOLVA, J. A. Immobilization of *Candida antarctica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, n. 60, 2012, p. 16.

GOOSEN, M.E.A. Applications of Chitin and Chitosan. **Tech. Publ. Comp.**, V.61, 1996, p. 3.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, n. 7-8, 2004, p. 330.

GOULA, M.; ADAMAPOULOS, K. G. Spray drying of tomato pulp in dehumidified air: I. The effect on product recovery. *Journal of Food Engineering*, v.66, 2005, p.34.

GOYA, G.F.; BERQUÓ, T.S.; FONSECA, F.C.; MORALES, M.P. Static and dynamic magnetic properties of spherical magnetite nanoparticles. **Journal of Applied Physics**. V. 94(5), 2003, p. 3519

GRIGOLON L. B., AZEVEDO A., SANTOS R. R., FRANCO T. T. Modification of Chitosan with Free and Immobilized Papain. **Chitin Enzymology** 2001, Ed. Atec, Italy, 2001.

GUBIN S. P., Introduction – Magnetic Oxides. **Magnetic Nanoparticles**, Edi. WILLEY-VCH Verlag Gmbh&Co, Federal Republic of Germany, 2009.

GUERFALI, M.; MAALEJ, I.; GARGOURI, A.; BELGHITH, H.; J. Catalytic Properties of the Immobilized *Talaromyces Thermophilus* B-Xylosidase and Its Use for Xylose and Xylooligosaccharides Production. **Mol. Catal. B: Enzymes**. V 57, 2009, p. 242.

GUO Z., SUN Y. Characteristics of Immobilized Lipase On Hydrofobic Superparamagnetic Microspheres to Catalyze Esterification. **Biotechnology. Prog.**, V. 20, 2004, p. 500.

GUPTA A. K., GUPTA M. Synthesis and Surface Engineering of Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. **Biomaterials**, V. 26, 2005, p. 3995.

GÜRSEL A., ALKAN S., TOPPARE L., YAGCI Y. Immobilization of Invertase and Glucose Oxidase in Conducting H-Type Polysiloxane/Polypyrrole Block Copolymers. **Reactive & Functional Polymers**. V. 57, 2003, p. 57.

HAAS, M.J. Patente No: 5697986, 1997.

HAJDU J, FRIEDRICH P. Reaction of Glutaraldehyde with NH₂ Compounds. A Spectrophotometric Method for The Determination of Glutaraldehyde Concentration. **Anal Biochem**. V 12, 1975, p. 273.

HAMA S., TAMALAMPUDI S., YOSHIDA A., TAMADANI N., KURATANI N., HIDEO NODAA, C, HIDEKI FUKUDAD, AKIHIKO KONDOB, Enzymatic Packed-Bed Reactor Integrated with Glycerol-Separating System for Solvent-Free Production of Biodiesel Fuel. **Biochemical Engineering Journal**, V. 55, 2011, p. 66.

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

HOLA K., MARKOVA Z., ZOPPELLARO G., TUCEK J., ZBORIL R. Tailored Functionalization of Iron Oxide Nanoparticles for MRI, Drug Delivery, Magnetic Separation and Immobilization of Biosubstances. **Biotechnology Advances**, 2015.

HRISTOV J., L. FACHIKOV. Overview of Separations Performed by Magnetically Assisted Fluidized Beds with A Special Emphasis to Waste Stream Cleaning, **China Particuology**, V. 5, 2007, p. 11.

HUANG J., LONG S., JIANG D., XIÃO H., ZHOU J. Immobilization of Pycnoporus Sanguineus Laccase On Magnetic Chitosan Microspheres. **Biochemical Engineering Journal**, V. 25, 2005, p. 15.

ILLANES A., ALTAMIRANO C. Enzyme Reactors. **Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications**. Chile: Springer Netherlands, 2008. p. 205

ISIK S., ALKAN S., TOPPARE L., CIANGA I., YAGCI Y. Immobilization of Invertase and Glucose Oxidase Inpoly 2-Methylbutyl-2-(3-Thienyl) Acetate/ Polypyrrole Matrices. **European Polymer Journal**. V. 39, 2003, p. 2375.

ISO M., CHEN B., EGUCHI M., KUDO T., SHRESTHA S. Production of Biodiesel Fuel from Triglycerides and Alcohol Using Immobilized Lipase. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 16, 2001, p. 53.

JANASI S. R., EMURA M., LANDGRAF F. J. G., RODRÍGUEZ D. The Effect of Synthesis Variables On the Magnetics Properties of Coprecipitated Barrium Ferrite Powders. **J. Magn. Magn. Mater.**, V. 238, 2002, p. 168.

JIN, G.; BIERMA, T. J.; HAMAKER, C. G.; MUCHA, R.; SCHOLA, V.; STEWART, J.; WADE, C. Use of a whole-cell biocatalyst to produce biodiesel in a water-containing system. **Journal Of Environmental Science And Health Part A**, v. 44, 2009, p. 21.

JOLIVET J. P., BELLEVILLE P., TRONC E. Influence of Fe(II) On The Formation of the Spinel Iron Oxide in Alkaline Medium. **Clays and Clay Minerals**, V 40, 1992, p. 531.

KAIEDA, M.; SAMUKAWA, T.; KONDO, A.; FUKUDA, H. Effect of methanol and water contents on production of biodiesel fuel from plant oil catalyzed by various lipases in a solvent-free system. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 91, 2001, p. 12.

KIM D. K., MIKHAYLOVA M., ZHANG Y., MUHAMMED M. Protective Coating of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Chem. Mater.**, V 15, 2003, p. 1617.

KIM J., GRATE J. W., WANG P. Nanostructures for Enzyme Stabilization. **Hem. Eng. Sci.**, V. 61, 2006, p. 1017.

KLAAS M. R., STEFFENS K., PATETT N. Biocatalytic Peroxy Acid Formation for Disinfection, **J. Mol. Cat. B: Enzyme.**, V 19, 2002, p. 499.

KRAJEWSKA B., Application of Chitin- And Chitosan-Based Materials for Enzyme Immobilizations: A Review. **Enzyme Microb. Technol.** V 35, 2004, p. 126.

KRIEGER N., TAIPA M. A., MELO E. H. M., LIMA-FILHO J. L., AIRES-BARROS M. R., CABRAL J. M. S. **Bioprocess Eng.** V 20, 1999, p. 59.

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

L'ÓPEZ-SERRANO P., CAO L., VAN RANTWIJK F., SHELDON R. A. Crosslinked Enzyme Aggregates with Enhanced Activity: Application to Lipases. **Biotechnology. Lett.**, V. 24, 2002, p. 1379.

LACAVA L.M., GARCIA V.A.P., KÜCKELHAUS S., AZEVEDO R.B., SADEGHIANI N., BUSKE N., MORAIS P.C. Long-term retention of dextran-coated magnetite nanoparticles in the liver and spleen. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 272–276, 2004, p. 2434

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

LAURENT S., DUTZ S., HÄFALI U. O., MAHMOUDI M., Magnetic Fluid Hyperthermia: Focus On Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles. **Advances, Colloid and Interface Science**, V 166, 2011, p 8.

LEE, Y., NOH, J., YI, S. Amino acid modified chitosan beads: Improved polymer supports for immobilization of lipase from *Candida rugosa*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, n. 57, 2009, p. 123.

LESLIE-PELECKY D. L., RIEKE R. D. Magnetic properties of nanostructured materials. **Journal of Materials Chemistry**, v. 8, 1996, p. 1770.

LI, Y., BAI, Y., LEI, L., YI, L., YANG, Y., XIA, C. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, n. 321, 2009, p. 252.

LI, Y., LI, G., ZHOU, Z. Immobilization of *saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, n.47, 2010, p. 21.

LIESE A., HILTTERHAUS L. Evaluation of Immobilized Enzymes for Industrial Applications. **Chemical Society Reviews**, V. 42, 2013, p. 6236.

LIN M. M., KIM D. K., HAJ A. J. E., DOBSON J., Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) For Translation Clinical Applications. **IEEE Transactions On Nanobioscience**, V 7, 2008, p 298.

LIU C., WANG F., OU-YANG F. Ethanol Fermentation in A Magnetically fluidized Bed Reactor with Immobilized *Saccharomyces Cerevisiae* in Magnetic Particles. **Bioresource Technology**, V 100, 2009, p. 878.

LODHIA J., MANDARANO G., FERRIS N. J., EU P., COWELL S. F. Development and Use of Iron Oxide Nanoparticles (Part 1): Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles for MRI. **Biomedical Imaging and Intervention Journal**, V 6, 2010, p. 1

LU A. H., SALABAS E. L., SCHUTH F., Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, And Application. **Angewandte Chemie-International Edition**, V. 46, 2007, p. 1222.

LU A. H., SCHMIDT W., MATOUSSEVITCH N., BONNEMANN H., SPLIETHOFF B., TESCHE B., BILL E., KIEFER W., SCHUTH F. Nanoengineering of A Magnetically Separable Hydrogenation Catalyst. **Angewandte Chemie-International Edition**, V. 43, 2004, p. 4303.

LUQUEZE R. C. **Síntese E Caracterização De Nanopartículas Magnéticas De Ferrita De Cobalto Recobertas Por 3-Aminopropiltrióxissilano Para Uso Como Material Híbrido Em Nanotecnologia**. Tese (Doutorado), Universidade De São Paulo, SP, 2006.

MAGALHÃES G. A. JR, SANTOS C. M. W., SILVA D. A., MACIEL J. S., FEITOSA J. P. A., PAULA H. C. B., DE PAULA R. C. M. Microspheres of chitosan/carboxymethyl cashew gum (CH/CMCG): Effect of chitosan molar mass and CMCG degree of substitution on the swelling and BSA release. *Carbohydrate Polymers*, V 77 (2), 2009, p.217.

MAHDAVI M., AHMAD M., HARON M., NAMVAR F., NADI B., RAHMAN M., AMIN J. Synthesis, Surface Modification and Characterisation of Biocompatible

Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. **Molecules**. V 18, 2013, p. 7533.

MAHMOUDI M., SANT S., WANG B., LAURENT S., SEN T., Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (Spions): Development, Surface Modification and Applications in Chemotherapy. **Advances Drug Delivery Reviews**, V 63, 2011, p 24.

MANO, E. B. **Introdução A Polímeros**, Edgard Blücher, São Paulo, 2001.

MANSUR, H. S., COSTA JR., E. S. Preparação e Caracterização de Blendas de Quitosana/Poli(Álcool Vinílico) Reticuladas Quimicamente com Glutaraldeído para Aplicação em Engenharia de Tecido. **Química Nova**, v. 31, 2008, p. 1460.

MARUM, D. S. **Biocatalisadores Magnéticos A Partir De Quitosana**. Tese (Mestrado), Universidade Estadual Do Norte Fluminense – UENF. Campos Dos Goytacazes - RJ, 2013.

MATEO C., PALOMO J. M., FERNANDEZ-LORENTE G., GUISÁN J. M., FERNANDEZ-LAFUENTE R., Improvement Of Enzyme Activity, Stability And Selectivity Via Immobilization Techniques. **Enzyme Microbiology Technology**, V. 40, 2007, p. 1451.

MEERSMAN E. Use of Monolayer Carrier in Brewery. **Cerevisiae and Biotechnology, Elmsford**, V.17, 1992, p.55.

MENDES A. A. **Seleção De Suporte E Protocolos De Imobilização De Lipases Para A Síntese Enzimática De Biodiesel**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal De São Carlos – UFSCAR. São Carlos – SP. 225p. 2009.

MENDES A. A., CASTRO H. F., OLIVEIRA P. C., GIORDANO R. L. C. Aplicação De Quitosana Como Suporte Para A Imobilização De Enzimas De Interesse Industrial. **Química Nova**, V. 34, 2011, p. 831.

MENDES A. A., CASTRO H.F., GIORDANO R.L.C. Triagem de suportes orgânicos e protocolos de ativação na imobilização e estabilização de lipase de *Thermomyces lanuginosus*. **Química Nova**, v. 36, 2013, p. 245.

MONTEIRO-JUNIOR O. A. C., AIROLDI C. Some Studies of Crosslinking Chitosan Glutaraldehyde Interaction in A Homogeneous System. **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 26, 1999, p. 119.

MORAIS P.C., GARG V.K., OLIVEIRA A.C., SILVA L.P., AZEVEDO R.B., SILVA A.M.L., LIMA E.C.D. Synthesis and characterization of size-controlled cobalt-ferrite-based ionic ferrofluids. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. V 225, 2001, p. 37.

MOREIRA A. B. R.; PEREZ V. H.; ZANIN G. M.; CASTRO H. F. Biodiesel Synthesis by Enzymatic Transesterification of Palm Oil with Ethanol Using Lipases from Several Sources Immobilized On Silica-Pva Composite. **Energy And Fuels**, V. 21, 2007, p. 3689.

MOREIRA, M. A. **Utilização De Lipases Em Reações De Epoxidação Químico Enzimática**. Dissertação (Mestrado). 74p. Universidade Federal De Santa Catarina – UFSC. Florianópolis – SC, 2003.

MORETO, J.A.; SZMOSKI, R.M.; CÓTICA, L.F.; PAESANO JR., A.; SANTOS, I.A.; CUNHA, J.B.M. Espectroscopia Mössbauer e refinamento estrutural no sistema cerâmico isomórfico (α -Fe₂O₃)-(α -Al₂O₃). **Cerâmica**. V. 53, 2007, p.175.

NAGAYAMA K., YAMASAKI N., IMAI M., Fatty Acid Esterification Catalyzed by *Candida rugosa* Lipase in Lecithin Microemulsion-Based Organogels. **Bioch. Eng. J.**, V 12, 2002, p. 231.

NARASIMHARAO K., LEE A., WILSON K. J. Biobased Mater. **Bioenergy** V 1, 2007, p. 19.

NASCIMENTO, A.L.C.; ALBUQUERQUE, I.L.T.; COSTA, A.C.F.M. Influência da Concentração de Agente Silano Sobre a Superfície da Ferrita $Ni_{0,5}Zn_{0,5}Fe_2O_4$ Visando Seu Uso Como Marcador Biológico. **Anais do 9º Cong. Latino-Americano de Órgãos Artif. e Biomat. 13º Cong. da Soc. Latino-Amer. de Biomat., Órgãos Artif. e Eng. de Tecidos – SLABO**. Foz do Iguaçu, PR; 2016;

NATIONAL BIODIESEL BOARD. **Anais Do Congresso Internacional De Biocombustíveis Líquidos**; Instituto De Tecnologia Do Paraná; Secretaria De Estado Da Ciência, Tecnologia E Ensino Superior; Curitiba; V 19 1998; p. 42.

NEDKOV I., MERODIISKA T., SLAVOV L., VANDENBERGHE R. E., KUSANO Y., TAKADA J. Surface Oxidation, Size and Shape of Nano-Sized Magnetite Obtained by Co-Precipitation. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, V. 300, 2006, p. 358.

NELSON D. L., COX. M. M. LEHNINGER **Principles of Biochemistry**; 3rd. Edition; Worth Publishers; 2000, 1151p.

NELSON J. M., GRIFFIN E. G. Adsorption of Invertase. **Journal Amer, Chemical**. V 38, 1916, p. 1109.

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

PAULA, A. V.; URIOSTE, D.; SANTOS, J. C.; CASTRO, H. F. Porcine pancreatic lipase immobilized on polysiloxane-polyvinyl alcohol hybrid matrix: catalytic

properties and feasibility to mediate synthesis of surfactants and biodiesel. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 82, n. 3, 2007, p. 281.

PEREIRA E. B., CASTRO H. F., AGNES E. J., MONDARDO R. M., AGUIAR R. O. Avaliação e comparação da eficiência de imobilização de lipase pancreática em quitosana para produção de ácidos graxos em frascos agitados. *Acta Scientiarum Technology*, n.1, 2010, p. 19.

PEREIRA E.B., ZANIN G.M., CASTRO H.F. Immobilization and Catalytic Properties of Lipase On Chitosan for Hydrolysis and Esterification Reactions. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, V. 20, 2003, p. 343.

PETCHAROEN K., SIRIVAT A. Synthesis and Characterization of Magnetite Nanoparticles Via the Chemical Co-Precipitation Method. **Materials Science and Engineering B**, V. 177, 2012, p. 421.

PILKINGTON P.H., MARGARITIS A., MENSOUR N.A., RUSSELL I. Fundamentals of Immobilized Yeast Cells for Continuous Beer Fermentation: A Review. **Journal of The Institute of Brewing**, V.104, 1998, p.19.

PINGARRÓN, J. M.; DÍEZ, P.; VILLALONGA, R.; VILLALONGA, M. L. Supramolecular immobilization of redox enzymes on cyclodextrin-coated magnetic nanoparticles for biosensing applications. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 386, 2012, p.181.

POPPE J. K., FERNANDEZ-LAFUENTE R., RODRIGUES R. C., AYUB M. A. Z. Enzymatic Reactors for Biodiesel Synthesis: Present Status and Future Prospects. **Biotechnology Advances**, V. 33, 2015, p. 511.

PRADO A. G. S., SANTOS A. L. F., PEDROSO C. P., CARVALHO T. O., BRAGA L. R., EVANGELISTA S. M. J. Vitamin A and vitamin E interaction behavior on chitosan microspheres. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, V 106(2), 2011, p. 415

RAMOS, B. G. Z. **Avaliação Do Potencial De Utilização De Um Poliuretano Obtido A Partir De Um Poliol De Origem Natural Como Material Polimérico Para A Micro E Nanoencapsulação De Fármacos.** Tese (Doutorado), Universidade Federal De Santa Catarina - UFSC. Santa Catarina 2006

RANGANATHAN, S. V., NARASIMHAN, S. L., MUTHUKUMAR, K., An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel. **Bioresource Technology**, v. 99, p.3975, 2008.

RATHMANN R. S., ZKLO A., SCHAEFFER R. Targets and Results of the Brazilian Biodiesel Incentive Program. **Applied Energy** v. 97, p.91, 2012.

REBELO, L. P. **Imobilização Da Lipase De Burkholderia Cepacia Resolução Cinética De Alcoóis Secundários Quirais.** Dissertação (Mestrado). Universidade De São Paulo, São Paulo, 2009.

ROBERTS G. A. F. **Chitin Chemistry**, The Macmillan Press, London 1992.

ROBINSON P.J., DUNNILL P., LILLY M.D. The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 5, 1973, p. 603.

ROCHA C. O. **Nanopartículas Magnéticas Como Suporte Para Imobilização De Lipases.** Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual Júlio De Mesquita Filho, Araraquara, SP, 2016.

RODRIGUES P. M., DAVID G.F., FERREIRA P. R., DELATORRE A.B., TEIXEIRA V.F.T., ROMÁN D.C.C., PEREIRA N.R., PEREZ V.H., ORREGO C.E., RODRIGUEZ R. S. Preparation of biocatalysts with magnetic properties: enzymatic and physical characterization seeking application in the processes assisted by magnetic fields. **Revista Mexicana de Física**, v. 58, 2012, p. 112.

RODRIGUES R. C. **Síntese De Biodiesel Através De Transesterificação Enzimática De Óleos Vegetais Catalizada Por Lipase Imobilizada Por Ligação Covalente Multipontual.** Tese (Doutorado) Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre – RS, 2009.

ROMÁN D.C.C., PEREZ V.H., CASTRO H. F., ORREGO, C.E., HERNAN-GIRALDO O., SILVEIRA JUNIOR E. G.; DAVID G. F. Ethyl esters (biodiesel) production by *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field. **Fuel (Guildford)**, v. 196, 2017, p. 481.

RORRER G.L., HSIEN T.-Y., WAY J.D. Synthesis of porous-magnetic chitosan beads for removal of cadmium ions from waste water **Ind. Eng. Chem. Res.**, 32 1993, p. 2170

RÓS P.C.M., SILVA W.C., GRABAUSKAS D., PEREZ V.H., CASTRO H. F., Biodiesel from babassu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. *Industrial Crops and Products*, v. 52, 2012, p. 313

ROSCA I. D., WATARI F., UO M. Microparticle Formation and Its Mechanism in Single and Double Emulsion Solvent Evaporation. **Journal of Controlled Release** v. 99, 2004, p 271.

ROSSET, I. G.; TAVARES, M. C. H.; ASSAF, E. M.; PORTO, A. L. M. Catalytic ethanolysis of soybean oil with immobilized lipase from *Candida antarctica* and ¹H NMR and GC quantification of the ethyl esters (biodiesel) produced. **Applied Catalysis A: General**, v. 392, 2011, p. 136.

SANTOS, R. R. **Caracterização E Aplicação De Borrás Do Refino De Óleos Vegetais Para Produção De Lipase Fúngica Por Fermentação No Estado Sólido.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal Rural Do Rio De Janeiro, Seropédica - RJ, 2012.

SHIMADA Y., WATANABE Y., SUGIHARA A., TOMINAGA Y., Enzymatic Alcoholysis for Biodiesel Fuel Production and Application of the Reaction to Oil Processing, **J. Mol. Cat. B: Enz**, V 17, 2002, p. 133.

SILVA G. A. M. **Síntese enzimática, caracterização físico-química e térmica de biodiesel de sebo bovino por rota etílica**. Dissertação (Mestrado) Escola de Engenharia de Lorena da Universidade de São Paulo, 2009.

SILVA G.S., RÓS P.C.M., SANTOS J.C., PEREZ V.H., CASTRO H. F. Enzymatic Transformation of Palm Oil in Biodiesel using Porcine Pancreatic Lipase Immobilized on Hybrid Matrix. **International Review of Chemical Engineering** (Testo Stampato), v. 1, 2012, p. 609.

SILVA, V.A.J.; ANDRADE, P.L.; SILVA, M.P.C.; BUSTAMANTE, D.A.; VALLADARES, L.L.S.; AGUIAR, J.A. Synthesis and characterization of Fe₃O₄ nanoparticles coated with fucan polysaccharides. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. V.343, 2013, p.138

SIMÕES A. S., Mori R. Y., Faria R., Castro H.F., Mendes A.A. Desempenho Da Matriz Híbrida SiO₂-Quitosana Na Imobilização Da Lipase Microbiana De Candida Rugosa. **Química Nova**, V. 34, 2011, p.33.

SOARES C. M. F., SANTANA M. H. A., ZANIN G. M., CASTRO H. F. Effect of poly (ethylene) glycol and albumin on the immobilization of microbial lipase and catalysis and catalysis in organic media. **Química Nova**, v. 26, 2003, p. 832.

SOLOMONS G., FRYHLE C. Química Orgánica. Tradução da 10ª edição americana, vols 1 e 2. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos Editora S. A., 2012. 815p.

SOLYMÁR M., LILJEBLAD A., LÁZÁR L., FÜLÖP F., KANERVA L. T. Lipase-Catalysed Kinetic Resolution in Organic Solvents: An Approach to Enantiopure A-Methyl-B-Alanine Esters. **Tetrahedron: Asymmetry**, V 13, 2002, p. 1923.

SOUMANOU, M. M.; BORNSCHEUER, U. T.; Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme Microbiology Technology**, v. 33, n. 1, 2003, p. 97.

SOUZA A. T. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro para Aplicações Biomédicas – Um Estudo Citotóxico em Linhagem Celular de Carcinoma Cervical Humano**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, SP, 2011.

SOUZA, J. F. **Desenvolvimento De Membranas De Polissulfona Para A Imobilização De Lipase**. Dissertação (Mestrado) - Universidade De Caxias Do Sul, Caxias Do Sul – RS, 2006.

SRIVATHSAN VR, SRINIVASAN LN, KARUPPAN M. An Overview of Enzymatic Production of Biodiesel. **Bioresour Technol**. V.99, 2008, p. 3975.

SUN J., ZHOU S., HOU P., YANG Y., WENG J., LI X., LI M., Synthesis and Characterization of Biocompatible Fe₃O₄ Nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research**, Part A, 2006a, p. 333.

SUN, S. H. Recent Advances in Chemical Synthesis, Self-Assembly, And Applications of Fept Nanoparticles. **Advanced Materials**, V. 18, 2006b, p. 393.

SZCZESNA-ANTCZAK, M. et al. Enzymatic biodiesel synthesis - Key factors affecting efficiency of the process. **Renewable Energy**, v. 34, 2009, p. 1185.

SZYMANSKA K., BRYJAK J., MROWIEC-BIALON J., JARZEBSKI A. B. Application and Properties of Siliceous Mesostructured Cellular Foams as Enzymes Carriers to Obtain Efficient Biocatalysts. **Microporous and Mesoporous Materials**, V. 99, 2007, p. 167.

TALBERT J. N., GODDARD J. M. Enzymes On Material Surfaces. **Colloids Surf., B.**, V. 93, 2012, p. 8.

TARDIOLI P.W. **Hidrólise controlada de proteínas do soro de queijo usando carboxipeptidase A e alcalase imobilizadas multipontualmente em agarose.** Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2003.

TEIXEIRA, V. F. T. **Estudo da obtenção de biocatalisadores com matrizes de alginato de cálcio visando a produção de biodiesel.** Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes, 2011.

THARANATHAN R.N., PRASHANTH K.V. H. Chitin/Chitosan: Modifications and Their Unlimited Application Potentialdan Overview. **Trends in Food Science & Technology.** V.18, 2007, p. 117.

THARANATHAN R.N, KITTUR FS. Chitin, The Undisputed Biomolecule of Great Potential. **Crit Reviews Food Science Nutr.** V 43, 2003, p. 61.

TINTOR C. B. **Utilização de resíduos gordurosos para a produção de biodiesel via enzimática.** Dissertação (Mestrado) –Universidade Federal de Alfenas- Poços de Caldas, MG, 2014.

TORRES E.A., CHIRINOS H.D., ALVES C.T., SANTOS D.C., CAMELIER L. A. Biodiesel: O Combustível Para O Novo Século. **Bahia Análise & Dados.** V16, 2006, p. 89.

VAIDYA B.K., INGAVLE G.C., PONRATHNAM S., KULKARNI B.D., NENE S.N. Immobilization of Candida Rugosa Lipase On Poly (Allyl Glycidyl Ether-Coethylene Glycol Dimethacrylate) Macroporous Polymer Particles. **Bioresour. Technol.** V. 99, 2008, p. 3623.

VALENZUELA R., FUENTES M. C., PARRA C., BAEZA J., DURAN N., SHARMA S. K., KNOBEL M., FREER J. Influence of Stirring Velocity On the Synthesis of Magnetite Nanoparticles (Fe₃O₄) By The Co-Precipitation Method. **Journal Of Alloys And Compounds**, V. 488, 2009, p. 227.

VALERIO S. G., **Imobilização de β-D- frutofuranosídeo frutohidrolase em partículas de quitosana**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre - RS, 2012.

VANDENBERGHE, R. E. **Mossbauer Spectroscopy and Applications Geology**. Faculty of Scienc, Gent State University, Gent, Belgica, International Training Centre for Post Graduate Soil Scientis, 94p, 1991.

VIEIRA, D. C. **Imobilização Da Enzima B–Galactosidase De Kluyveromycesfragilis Em Agarose E Quitosana Utilizando Diferentes Protocolos De Ativação**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal De São Carlos, São Carlos- SP, 2009.

VILLENEUVE P., MUDERHVA J. M., GRAILLE J., HAAS M. J. Customizing Lipases for Biocatalysis: A Survey of Chemical, Physical and Molecular Biological Approaches. **Journal Of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, V. 9, 2000, p. 113.

VITOLO, M.; Imobilização De Enzimas.IN: LIMA U.A., AQUARONE E., BORZANI W., SCHMIDELL W. **Biotecnologia Industrial, Processos Fermentativos E Enzimáticos**. São Paulo, SP: Edgard Blücher Ltda, V 3, 2001, p. 391.

WEETALL H. H., DETAR, C. C. Covalent Attachment of Proteins to Inorganic Supports Directly by Activation with Cyanogen Bromide. **Biotechnology, Bioeng.** V 17, 1975, p. 295.

WEI X., VIADERO R. C., Synthesis of Magnetic Nanoparticles with Ferric Iron Recovered from Acid Mine Drainage: Implications for Environmental

Engineering. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, V 294, 2007, p. 280.

WU, C.; ZHOU, G.; JIANG, X.; MA, J.; ZHANG, H.; SONG, H. Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica **Process Biochemistry** V. 47, 2012, p. 953.

XIE W., MA N. Immobilized Lipase On Fe₃O₄ Nanoparticles as Biocatalys for Biodiesel Production. **Energy & Fuels**, V. 23, 2009, p. 1353.

ZHANG L. H., BAI C. H., WANG Y. S., JIANG Y. C., HU M. C., LI S. N., ZHAI Q. G. Improvement of chloroperoxidase stability by covalent immobilization on chitosan membranes. **Biotechnology. Lett.** v. 31, 2009a, p. 1269.

ZHANG L., HE R., GU H.C. Oleic acid coating on the monodisperse magnetite nanoparticles. **Appl. Surf. Sci.** v. 253, 2006, p. 2611.

ZHANG L., ZHU X., ZHENG S., SUN H., Photochemical preparation of magnetic chitosan beads for immobilization of pullulanase. **Biochem. Eng. J.** v. 46, 2009b, p. 83

ZHOU G. X., CHEN G. Y., YAN B.B. Biodiesel Production in A Magnetically Stabilized, Fluidized Bed Reactor with Immobilized Lipase in Magnetic Chitosan Microspheres. **Biotechnol Lett.** V. 36, 2014, p. 63.

ZHOU Z., HARTMANN M., Progress in Enzyme Immobilization in Ordered Mesoporous Materials and Related Applications. **Chem. Soc. Rev.** V 42, 2013, p. 3894.