

**FORMULAÇÃO DE BIOCATALISADORES COM PROPRIEDADES  
MAGNÉTICAS UTILIZADOS NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA  
ENZIMA *Amano AK (Pseudomonas fluorescens)***

**DARLAN SILVEIRA MARUM**

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE

DARCY RIBEIRO – UENF

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO – 2018

**FORMULAÇÃO DE BIOCATALISADORES COM PROPRIEDADES  
MAGNÉTICAS UTILIZADOS NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA  
ENZIMA *Amano AK (Pseudomonas fluorescens)***

**DARLAN SILVEIRA MARUM**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obter o título de Doutor em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Orientador: Prof. Rubén J. Sánchez Rodríguez

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO – 2018

**FICHA CATALOGRÁFICA**

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pelo autor.

M389

Marum, Darlan Silveira.

Formulação de biocatalisadores com propriedades magnéticas utilizados no processo de imobilização da enzima Amano AK (*Pseudomonas fluorescens*). / Darlan Silveira Marum. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2018.

131 f. : il.

Bibliografia: 88 - 115.

Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência dos Materiais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologia, 2018.

Orientador: Rubén Jesus Sánchez Rodríguez.

1. Quitosana. 2. Carbodiimida. 3. Imobilização enzimática. 4. Biocatalisadores. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 620.11

**FORMULAÇÃO DE BIOCATALISADORES COM PROPRIEDADES  
MAGNÉTICAS UTILIZADOS NO PROCESSO DE IMOBILIZAÇÃO DA  
ENZIMA *Amano AK (Pseudomonas fluorescens)***

**DARLAN SILVEIRA MARUM**

“Tese apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologia, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências para obter o título de Doutor em Engenharia e Ciência dos Materiais”.

Aprovada em 11 de julho de 2018

Banca Examinadora:

---

Elaine Aparecida Santos Carvalho (D.Sc., Engenharia e Ciência dos Materiais) – UENF/CCT

---

Paulo Sergio Rangel Cruz da Silva (D.Sc., Ciência e Tecnologia de Polímeros) – IMA/UFRJ

---

Djalma Souza (D.Sc., Engenharia e Ciência dos Materiais) – UENF/CCT

---

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

“Dedico esse trabalho aos  
meus pais e ao meu sobrinho  
Levi ”

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus por estar sempre ao meu lado segurando em minha mão nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Deuzedir e Leida, por serem meu porto seguro e por todo amor a mim depositado. A minha irmã, Deuziane por estar ao meu lado sempre me encorajando a seguir em minha caminhada.

Agradeço também a todos os meus familiares e amigos pelo carinho e por estarem sempre presentes em minha vida, nos bons momentos e nos mais difíceis, quando precisei de uma palavra amiga e de abraço.

Ao meu orientador Doutor Rúbens Sánchez por me passar um pouco dos seus conhecimentos, me orientando neste trabalho com carinho e dedicação. E aos demais professores do programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais pelos ensinamentos que contribuíram para a construção da minha vida acadêmica.

Aos meus colegas do Laboratório do Setor de Polímeros por sempre estarem disponíveis, me ajudando a completar mais esta etapa da minha vida acadêmica: Gabriel, Mariana, Marcos, Katia, Tarcilia, Tcharllis, Dhyemila Leticia e aos demais. Vocês tornaram os meus dias mais leves e agradáveis.

Ao Professor Doutor Flávio C. Miguens (*in memoria*) 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.

A professora Valdirene Moreira Gomes do Laboratório de Fisiologia e Bioquímica de Microrganismos do CBB/UENF e aos seus alunos Júlia e Gabriel pela colaboração na realização das análises de quantificação da lipase.

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.

À Yandira Barros e ao Laboratório de Caracterização de Materiais, do Instituto Federal do Espírito Santo – IFES – Campus Vitória, e a técnica Rosane no Laboratório de Ciências Físicas – UENF pelo suporte na realização da análise de DRX.

Gostaria de agradecer aos meus amigos que me receberam de braços abertos e contribuíram de uma maneira para a realização deste trabalho: à Ellen

por sempre estar ao meu lado compartilhando seus conhecimentos e me ajudando sempre com os experimentos, à Mayara pelas suas consultorias nos cálculos estequiométricos e as nossas andanças pelos laboratórios e ao Magno por sempre me incentivar a seguir em frente, mesmo quando tudo parecia estar dando errado. Tenho um carinho enorme por eles.

Em especial a minha amiga Elaine que sempre esteve ali do meu lado nunca deixando a peteca cair, sempre me chamando a atenção e sem dúvida pela sua companhia em toda a minha vida acadêmica. Serei eternamente grato.

À CAPES e FAPERJ pelo apoio financeiro e a UENF pela estrutura física e oportunidade oferecida para a realização deste trabalho.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para este estudo, deixo o meu muito obrigado!

*“Sim, você é louco, louquinho. Mas vou lhe contar um segredo: as melhores pessoas são assim!”*

Lewis Carroll

## SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS .....	iv
ÍNDICE DE TABELAS .....	vi
ÍNDICE DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES .....	vii
<b>CAPÍTULO 1 – INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 – OBJETIVOS .....	3
1.1.1 – OBJETIVO GERAL .....	3
1.1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
1.2 – JUSTIFICATIVA .....	4
1.3 – INEDITISMO .....	6
<b>CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
2.1 – BIOCATALISADORES NO PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO ....	7
2.1.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	14
2.1.2 – INTRODUÇÃO DE ESPAÇADOR NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA .....	18
2.2 – POLISSACARÍDEOS COMO SUPORTE POLIMÉRICO DE ENZIMAS..	20
2.2.1 – QUITOSANA COMO SUPORTE POLIMÉRICO .....	23
2.3.2 – MODIFICAÇÃO DOS GRUPOS HIDROXILA DA QUITOSANA COM CARBODIIMIDA .....	26
2.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO .....	31
2.3.1 – PARAMETROS QUE AFETAM A CINÉTICA ENZIMÁTICA .....	32
2.3.1.1 – TEMPERATURA DO PROCESSO .....	33
2.3.2.2 – pH DO MEIO REACIONAL .....	34
2.3.1.3 – MODIFICAÇÃO DO GRAU DE HIDROFILICIDADE .....	36

2.4 – BIOCATALISADORES COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS .....	38
<b>CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>41</b>
3.1 – MATERIAIS .....	41
3.2 – MÉTODOS .....	42
3.2.1 – SÍNTESE DA NANOMAGNETITA (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) .....	42
3.2.2 – FORMULAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA .....	43
3.2.3 – ATIVAÇÃO DOS GRUPOS HIDROXILA DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA .....	44
3.2.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA .....	44
3.2.4.1 – ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR) .....	45
3.2.4.2 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	45
3.2.4.3 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO DAS MICROESFERAS POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA) .....	47
3.2.4.4 – ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS) .....	47
3.2.4.5 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DOS SUPORTES DE QTS E QTS-MODIFICADA .....	47
3.2.4.6 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROESFERAS .....	48
3.2.4.7 – GRAU DE CRISTALINIDADE .....	48
3.2.4.8 – DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS AMINOS DA QUITOSANA .....	52
3.2.5 – FORMULAÇÃO DOS SUPORTES COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS .....	50
3.2.6 – IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE DE QUITOSANA .....	51
3.2.7 – QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA .....	52
3.2.7.1 – TEOR DE ENZIMA IMOBILIZADA .....	52

3.2.8 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA .....	53
3.2.9 – ESTUDO DO EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	54
3.2.9.1 – IMPACTO DO pH SOBRE ATIVIDADE ENZIMÁTICA .....	54
3.2.9.2 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE ATIVIDADE HIDROLÍTICA .....	54
<b>CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>55</b>
4.1– MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM AGENTES BIFUNCIONAIS .....	55
4.2 – ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO DAS MICROESFERAS MODIFICADAS (FTIR) .....	56
4.3– ESTRUTURA E COMPORTAMENTO TÉRMICO DAS QTS MODIFICADAS COM EDC.....	59
4.3.1 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA FORMAÇÃO DE FRAGMENTOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA .....	61
4.4 – GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QTS ANTES E DEPOIS DA MODIFICAÇÃO .....	65
4.5 – CRISTALINIDADE DAS MICROEFERAS DE QTS SEM MODIFICAR E MODIFICADAS .....	69
4.6 – DINÂMICA MOLECULAR DA QUITOSANA NAS MICROESFERAS .....	73
4.7 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS SUPORTES QTS <i>in Natura</i> E MODIFICADOS QTS-AM .....	75
4.8 – RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE AMANO AK NOS SUPORTES QTS-EDC .....	79
4.9 – EFEITO DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE CATALÍTICA DOS BIOCATALISADORES FORMULADOS .....	81

<b>CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES .....</b>	<b>86</b>
<b>CAPÍTULO 6 – RECOMENDAÇÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>CAPÍTULO 7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Transesterificação de triglicerídeos (Aarthy et al., 2014) .....	8
<b>Figura 2</b> – Processo de produção de biodiesel a) etapas do processo químico b) etapas do processo enzimático (Adaptação de Christopher et al., 2014) .....	9
<b>Figura 3</b> – Diferentes reações catalisadas pelas lipases (Vlnieska, 2013) .....	10
<b>Figura 4</b> – Conformação estrutural da lipase <i>Candida rugosa</i> a) Conformação fechada; b) conformação aberta (Rodrigues, 2009) .....	13
<b>Figura 5</b> – Diferentes métodos para a imobilização (Poppe et al., 2015) .....	14
<b>Figura 6</b> - Estrutura de um polissacarídeo estrutural .....	22
<b>Figura 7</b> – Estrutura de um polissacarídeo de reserva .....	22
<b>Figura 8</b> – Processo de desacetilação da quitina em quitosana (Martins, 2008) .....	23
<b>Figura 9</b> – Biocompatibilidade e versatilidade da quitosana (Adaptação de Balan & Verestiuc, 2014) .....	25
<b>Figura 10</b> – Estrutura química da celulose, quitina e quitosana (Martins 2008) .....	25
<b>Figura 11</b> – Derivados da quitosana (Adaptação de Martins, 2008) .....	26
<b>Figura 12</b> – Representação dos grupos funcionais da quitosana (Adaptado de Mourya & Inamdar 2008) .....	27
<b>Figura 13</b> – Estrutura química A) grupo funcional da carbodiimida B) EDC – isômero da carbodiimida .....	29
<b>Figura 14</b> – Esquema da imobilização de enzima em um suporte carboxilado (Adaptação de Oliveira e Vieira, 2007) .....	30
<b>Figura 15</b> – Esquema da ativação dos grupos hidroxila da quitosana com o agente EDC (Chiou & Wu; 2004) .....	30
<b>Figura 16</b> – Efeito da temperatura no processo de transesterificação A) PF livre B) PF imobilizada (Iso et al., 2001) .....	34
<b>Figura 17</b> – Efeito do pH sobre a atividade (Yong et al. ,2008) .....	35
<b>Figura 18</b> – A estrutura da superfície de diferentes microesferas. (Adaptação de Zhang et al., 2012) .....	37
<b>Figura 19</b> – Efeito hidrofóbico/hidrofílico da superfície de microesferas magnéticas na imobilização da lipase (Adaptado de Zhang et al., 2012) .....	38

<b>Figura 20</b> – Difratoograma de Raios-X da magnetita sintetizada (Bôa Morte, 2017)	42
<b>Figura 21</b> – Micrografia eletrônica de transmissão das nanomagnetitas (Bôa Morte, 2017)	42
<b>Figura 22</b> - Curva de magnetização de saturação da nanomagnetita (Bôa Morte, 2017)	43
<b>Figura 23</b> – Esquema formulado para a técnica de coagulação	43
<b>Figura 24</b> – Mecanismo de ativação da QTS com Carbodiimida	55
<b>Figura 25</b> – Espectros de transmitância no Infravermelho das esferas de quitosana <i>in Natura</i> e modificadas	57
<b>Figura 26</b> – Espectros de absorbância no Infravermelho das esferas de quitosana <i>in Natura</i> e modificadas	58
<b>Figura 27</b> – Curvas termogravimétricas dos suportes de QTS <i>in Natura</i> e modificadas com EDC	60
<b>Figura 28</b> – Espectro de massa e Termograma isotérmicos da quitosana <i>in Natura</i>	61
<b>Figura 29</b> – Espectro de massa e Termograma isotérmicos da quitosana	62
<b>Figura 30</b> – Espectro de massa dos fragmentos $m/z$ 42 e $m/z$ 57 da quitosana <i>in Natura</i> e modificada com EDC	63
<b>Figura 31</b> – Espectro de massa dos fragmentos $m/z$ 67 e $m/z$ 94 da quitosana <i>in Natura</i> e modificada com EDC	64
<b>Figura 32</b> – Mecanismo de fragmentação (MacLafferty) dos agrupamentos acetamida que podem originar o fragmento $m/z$ 42	64
<b>Figura 33</b> – Mecanismo de fragmentação (MacLafferty) dos agrupamentos acetamida que podem originar o fragmento $m/z$ 57	65
<b>Figura 34</b> – Espectro de absorbância da QTS <i>in Natura</i>	66
<b>Figura 35</b> – Espectro de absorbância da QTS modificada (QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3)	68
<b>Figura 36</b> – Difratoograma de Raio-X da quitosana <i>in Natura</i> e modificadas	69

<b>Figura 37</b> – Deconvolução dos picos de difração das amostras de quitosana <i>in Natura</i> e das quitosanas modificadas (QTS AM1 e QTS AM2) .....	71
<b>Figura 38</b> - Deconvolução dos picos de difração da amostra de quitosana modificada (QTS AM3) .....	72
<b>Figura 39</b> – Curva de domínios das microesferas de quitosana .....	75
<b>Figura 40</b> – Micrografia eletrônica A) microesfera de QTS B) superfície da microesfera QTS; C) microesfera de QTS-AM2, D) superfície da microesfera QTS-AM2 .....	76
<b>Figura 41</b> – Micrografia eletrônica A) microesfera modificada QTS-AM1 B) superfície da microesfera QTS-AM1; C) microesfera modificada QTS-AM3, D) superfície da microesfera QTS-AM3 .....	77
<b>Figura 42</b> – Distribuição de tamanho dos suportes de QTS (A) e QTS-EDC (B) (média dos resultados das amostras QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3) .....	78
<b>Figura 43</b> – Efeito do pH sob a atividade relativa das enzimas imobilizadas A) pH6,5 B) pH7,5 e C) pH8,5 .....	82
<b>Figura 44</b> – Efeito da temperatura sob a atividade relativa da lipase Amano AK livre e imobilizada .....	84

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Comparação do método químico e enzimático para a produção de biodiesel (Gog <i>et al.</i> , 2012; Aarthy <i>et al.</i> , 2014) .....	7
<b>Tabela 2</b> – Lipases utilizadas no processo de produção de biodiesel .....	11
<b>Tabela 2</b> – Continuação .....	12
<b>Tabela 3</b> – Métodos de imobilização enzimática para a produção de biodiesel .....	16
<b>Tabela 3</b> – Continuação .....	27
<b>Tabela 4</b> – Vantagens e desvantagens encontrados nos métodos de imobilização (Tan <i>et al.</i> 2010) .....	18
<b>Tabela 5</b> – Otimização do valor do pH na catalise enzimática .....	36
<b>Tabela 7</b> – Relação de intensidade dos grupamentos, antes e após a modificação .....	59
<b>Tabela 8</b> – Valores percentuais do grau de acetilação (GA) e desacetilação (GD), para a quitosana <i>in natura</i> e modificada (bandas A1320 / A1420) .....	67
<b>Tabela 9</b> – Grau de cristalinidade da quitosana <i>in natura</i> e das microesferas de quitosanas modificadas .....	72
<b>Tabela 10</b> - Tempo de Relaxação spin-rede das amostras de quitosana com 2 exponenciais .....	74
<b>Tabela 11</b> – Valores da distribuição de tamanho dos suportes de QTS <i>in Natura</i> e QTS–EDC .....	78
<b>Tabela 12</b> – Rendimento de imobilização e atividade da lipase imobilizada preparada por três diferentes protocolos de imobilização binária .....	80
<b>Tabela 13</b> – Efeito da variação do pH sob a atividade relativa da enzima livre e imobilizada .....	81
<b>Tabela 14</b> – Efeito da variação da temperatura sob a atividade relativa da enzima livre e imobilizada .....	83

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$C_{18}H_{34}O_2$  – Ácido Oleico

CCT – Centro de Ciências e Tecnologia

CCTA – Centro de Ciências e Tecnologia Agrária

DRX – Difração de Raios-X

$Fe_3O_4$  – Magnetita

FTIR – Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

KBr – Brometo de potássio

LAMAV – Laboratório de materiais avançados

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

SEPOL – Setor de Polímeros

TGA – Análise termogravimétrica

UENF – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro

USP – Universidade de São Paulo

EDC – 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida

QTS – Quitosana

NaOH – Hidróxido de sódio

m/v – massa / volume

v/v – volume / volume

rpm – rotação por minuto

$N_2$  – gás nitrogênio

ATR – Reflexão total atenuada

$T^1H$  – Próton de spin rede

IMA – Instituto de macromoléculas

UFRJ – Universidade Federal do Rio de Janeiro

$\mu g$  – micrograma

min – minuto

uma – Unidade de massa atômica

KeV – unidade de aceleração de voltagem

Å – angstrom

mA – miliampere

LCFIS – Laboratório de Ciências Físicas

BSA – Albumina de soro bovino

PEG – Polietilenoglicol

pH – potencial de hidrogênio

MS – Espectrômetro de massa

GLU – Glutaraldeido

AM – Amostra

## RESUMO

No Brasil e no mundo, várias propostas estão surgindo para minimizar problemas ocorridos ao meio ambiente, que neste caso, busca alternativas de adotar atitudes no cotidiano que sejam menos agressivas. Neste contexto, novas alternativas biotecnológicas vem sendo implementadas pelas indústrias, com a utilização de enzimas imobilizadas em suportes com propriedades magnéticas, sendo utilizadas como catalisadores nos processos de transesterificação, afim de eliminar as desvantagens ocasionadas nos processos convencionais. O objetivo deste trabalho foi formular um suporte polimérico com propriedades magnéticas para desenvolver biocatalisadores através da imobilização da enzima *Amano AK*. Assim sendo, foram investigadas diferentes formas de modificações superficiais do suporte, onde através da otimização dos parâmetros de pH e temperatura da atividade catalítica pelo processo de emulsificação do azeite de oliva, foi possível então, investigar o impacto das modificações sobre a eficácia dos biocatalisadores formulados. As modificações nas microesferas foram investigadas utilizando as técnicas de caracterização estrutural por Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de baixo campo (RMN), termogravimetria (TGA), Difração de Raio-X. A atividade hidrolítica da emulsão do azeite de oliva, encontrada no estudo do pH e da temperatura, para enzima *Pseudomonas fluorescens* (*Amano AK*), imobilizada em suporte de quitosana ativado com carbodiimida (EDC). Tendo um ambiente ideal na faixa de pH 7,5 a 40°C, obtendo assim 76,2% da atividade relativa, em relação a sua forma livre. Os biocatalisadores formulados neste trabalho, se mostram promissores para o uso em processo de transesterificação na produção de biodiesel em reatores fluidizados com estabilidade magnética. Pois apresentam características apropriadas para a imobilização de enzimas, que através da ativação dos grupos funcionais da quitosana, possibilitam a melhora na estabilidade da enzima, acarretando então, num melhor rendimento da atividade enzimática.

*Palavras Chaves: Quitosana, Carbodiimida, Imobilização enzimática, Biocatalisadores*

## ABSTRACT

In Brazil the adoption of less aggressive practices in daily life are being proposed as an alternative to minimize environmental issues. In this context, new bio based techniques have been implemented within the industry field such as, the usage of magnetic support to immobilize enzyme that participate in the transesterification process as catalysts, which can eliminate the drawbacks of conventional process. The goal of this work was to formulate a polymeric support with magnetic properties to develop biocatalyst through the immobilization of *Amano AK* enzyme. Different ways of surface modification of the support were investigated and through the optimization of pH and temperature of the catalytic activity by the emulsification process of olive oil it was possible to investigate the effect of the modifications on the efficacy of the developed biocatalysts. The microspheres modifications were investigated using structural characterization techniques such as infrared spectroscopy (FTIR), nuclear magnetic resonance (NMR), thermogravimetry (TGA) and X-ray diffraction. The hydrolytic activity of the olive oil emulsification found in the pH and temperature investigation, for the *Amano AK (Pseudomonas fluorescens)* immobilized in chitosan activated with EDC has pH equal 7,5 at 40°C as the ideal environment, leading to 76,2% of relative activity when compared to its free form. The biocatalysts developed in this work show promising results for its use in transesterification process for the biodiesel production in fluid reactors with magnetic stability. This is due the characteristic to immobilize enzyme through the activation of chitosan functional groups improving the stability of the enzyme, leading to a higher efficiency of enzymatic activity.

*Keywords: Chitosn, Carboimide, enzymatic immobilization, biocatalyst.*

## **CAPITULO 1: INTRODUÇÃO**

No Brasil e no mundo, diversas propostas têm surgido para minimizar problemas com o meio ambiente, que neste caso, busca alternativas e atitudes no cotidiano que sejam menos agressivas (Marum, 2013; Román et al. 2017).

A produção de biocombustíveis através dos métodos convencionais de transesterificação com a utilização de um catalisador químico, ainda que apresente altos rendimentos, enfrenta graves problemas com geração de resíduos que contaminam efluentes e alto gasto energético (Román et al. 2017)

Neste contexto, novas alternativas biotecnológicas vêm sendo testadas pelas indústrias, com a utilização de enzimas como catalisadores nos processos de transesterificação, a fim de eliminar os inconvenientes do processo convencional. (Román et al. 2017; Zhou et al., 2014; Lew et al., 2014). Entretanto, a utilização de enzimas livres apresenta dificuldades com: a estabilidade da enzima no decorrer do processo reacional, a recuperação destas e sua reutilização, o que gera um alto custo (Zhou et al., 2014; Lew et al., 2014; Hama et al., 2013; Yaakob et al., 2013; Gogue et al., 2012).

A imobilização de enzimas em suportes de diversas fontes que apresentem propriedades magnéticas, tem como vantagem a fácil recuperação do biocatalisador do meio reacional, o reuso durante vários ciclos e a melhora da estabilidade enzimática em relação a sua forma livre, onde viabiliza sua utilização em processos contínuos, utilizando reatores de leito fluidizado assistidos com um campo magnético externo (Dalla-Vecchia et. al. 2004, Boa Morte, 2017).

Ao longo dos últimos anos, vários materiais poliméricos foram estudados com o propósito de formular um suporte com as propriedades magnéticas desejadas para a imobilização de enzimas (Tian et al., 2008; Marum, 2013; Zhou et al., 2014; Román et al. 2017).

Dentre dos suportes poliméricos objeto de estudo, a quitosana se destaca, por ser um polímero natural de elevada disponibilidade e sua funcionalidade química oferecem alternativas de modificação em função da formulação

desejada permitindo a obtenção de suportes com sítios de imobilização enzimática, morfologias e tamanhos diferentes, características estas que influenciam na atividade enzimática (Edgar et al., 2001; Torres et al., 2005; Tian et al., 2008; Marum, 2013).

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi estudar e formular um suporte polimérico com propriedades magnéticas para imobilizar a lipase obtida a partir da *Pseudomonas fluorescens*, com vista na sua utilização em reações de transesterificação, visando seu posterior uso na produção de biodiesel em reatores de leito fluidizado estabilizado por um campo magnético externo. Assim sendo, foi realizada a modificação química da superfície do suporte, e avaliado, no processo de hidrólise do azeite de oliva, o impacto da modificação na atividade catalítica relativa.

## 1.1 – OBJETIVOS

### 1.1.1 – OBJETIVO GERAL

O objetivo desse trabalho é modificar e caracterizar um suporte a partir da quitosana contendo um núcleo com propriedades magnéticas para imobilização da lipase AK visando sua aplicação em reatores de leite fluidizado estabilizados por um campo magnético externo.

### 1.1.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanomagnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), que apresentem propriedades superparamagnéticas.
- Formular e caracterizar microesferas de quitosana contendo nanomagnetita com uma morfologia (casca/núcleo).
- Modificar quimicamente a superfície das microesferas de quitosana, utilizando como agente bifuncional a carbodiimida.
- Caracterizar as modificações realizadas nas microesferas de quitosana com auxílio das técnicas de Espectroscopia no infravermelho (FTIV), térmicas (TG-MS) e de Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo.
- Imobilizar covalentemente a lipase avaliando o rendimento de imobilização nas condições selecionadas.
- Analisar o impacto das modificações dos suportes de quitosana sobre a atividade relativa da Lipase *Amano AK* e o efeito do pH e da temperatura sobre a atividade.

## 1.2 – JUSTIFICATIVA

A transesterificação de óleos e gordura animal através de um catalisador químico, está sendo o mais utilizado pelas indústrias no processo de produção do biodiesel, entretanto, como citado anteriormente, vem apresentando desvantagens como: a grande produção de resíduos químicos (alcalinos) e a utilização de óleos refinados com baixo teor de ácidos graxos livres, que corresponde cerca de 80% do custo total da produção, prejudicando o meio ambiente e a competitividade econômica do biodiesel em comparação ao diesel (Román et al., 2017; Agueiras et al., 2015; Zhou et al., 2014).

O processo de transesterificação utilizando um catalisador químico, apresenta dificuldades em manusear o controle dos fluídos, pois necessita a remoção total da água do meio, produzindo assim, grande quantidade de resíduos ácidos, causando sério impacto ambiental e ocasiona problemas de corrosão em equipamentos (Aguieiras et al., 2015; Guldhe et al., 2015).

Entretanto, o processo enzimático na síntese do biodiesel apresenta algumas restrições tais como: a estabilidade da enzima no decorrer do processo, a recuperação e a sua reutilização assim como a restrições nas variáveis operacionais (Aguieiras et al., 2015; Román et al., 2017).

A fim de tornar economicamente viável o processo enzimático e adequar este as exigências industriais, surge como alternativa a imobilização de enzimas em um suporte sólido que permita aumentar a estabilidade da enzima; a separação do meio reacional e a sua reutilização durante vários ciclos reacionais (Yan et al., 2014; Guldhe et al., 2015; Bôa Morte, 2017).

Além do mais, com a incorporação de núcleos magnéticos aos suportes utilizados na imobilização de enzimas permite sua aplicabilidade em reatores fluidizados assistidos por um campo magnético externo, facilitando também a separação do meio reacional (Poppe et al., 2015; Román et al. 2017; Bôa Morte, 2017).

Assim sendo o presente trabalho foi voltado para:

- ▶ Contribuir com o desenvolvimento sustentável, usando materiais de fonte renovável de elevada disponibilidade na região (São Joao da Barra e Farol de São Thomé)
- ▶ Desenvolver uma formulação (biocatalisador) que tornem viável econômica e ambientalmente favorável aos processos de transesterificação na indústria brasileira e no particular o biodiesel, fonte alternativa de grande relevância para o Brasil e a região de Campos dos Goytacazes.
- ▶ Contribuir ao acervo de conhecimentos na área de suportes catalíticos a partir de recursos renováveis para a imobilização de enzimas.

### 1.3 – INEDITISMO

A formulação do biocatalisador é feita através de imobilizações de enzimas em um determinado suporte. Trabalhos reportados na literatura (Agueiras et al., 2015; Gude et al., 2015; Silva et al., 2016), utilizam diversos suportes, sejam naturais ou sintéticos, onde através de distintas modificações é possível então, imobilizar enzimas de diferentes fontes (bacteriana, fúngica, vegetal ou animal).

A maioria das enzimas aplicadas como biocatalisadores nos processos de bioconversão de triglicerídeos, são obtidas comercialmente, tendo um enfoque maior as de origem microbiana, utilizando vários métodos de imobilização. Neste contexto, não há relatos na literatura, sobre a utilização da *Pseudomonas fluorescens*, imobilizada em um suporte natural com propriedades magnéticas, envolvendo o método de ativação binária, onde são utilizados dois reagentes bifuncionais capazes de aumentar os sítios ativos de um suporte.

Assim, o presente trabalho tem como ineditismo o estudo do impacto da modificação com 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) da quitosana utilizando metodologias diferentes e a presença de um segundo agente bifuncional, glutaraldeído (GLU), avaliando a atividade catalítica relativa a diferentes pH e temperaturas e estabelecendo sua relação com a modificação da quitosana.

## CAPITULO 2: REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – BIOCATALISADOR NO PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

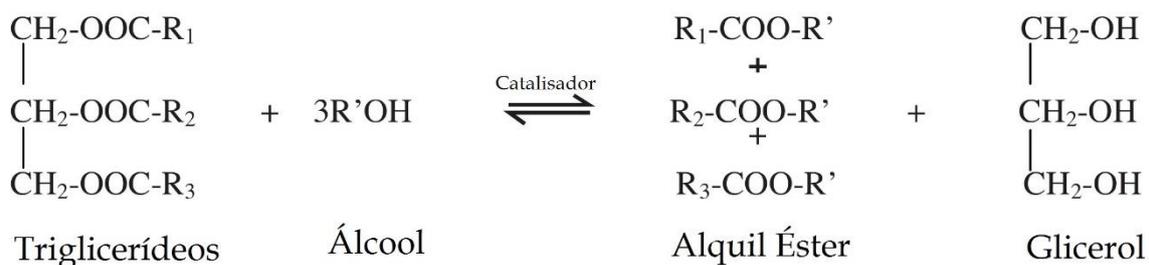
Em se tratando de produção de biocombustíveis a nível industrial, o método mais adotado, ainda é a transesterificação de óleos vegetais ou animais, utilizando um catalisador químico. Tal processo apresenta boa conversão do substrato e um baixo tempo de produção, por outro lado, possui grandes desvantagens tais como: a não reutilização do catalisador, a contaminação de afluentes, através do descarte dos catalisadores e o alto gasto energético durante todo o processo (Tabela 1). A fim de amenizar essas desvantagens, enzimas estão sendo utilizadas como biocatalisadores (Gog *et al.*, 2012; Aarthy *et al.*, 2014; Christopher *et al.*, 2014).

**Tabela 1** – Comparação do método químico e enzimático para a produção de biodiesel (Gog *et al.*, 2012; Aarthy *et al.*, 2014).

Parâmetro	Método químico		Método enzimático
	Processo Ácido	Processo Alcalino	
Rendimento de biodiesel	> 90%	> 96%	> 96%
Conteúdo AGL* no substrato	Convertido em biodiesel	Formação de sabão	Convertido em biodiesel
A água no substrato	Interferência com reação	Interferência com reação	Sem influência
A purificação de ésteres metílicos	A lavagem repetida	A lavagem repetida	Nenhum
Recuperação de glicerol	Complexo, glicerol de baixa qualidade	Complexo, glicerol de baixa qualidade	Fácil, glicerol de alta qualidade
Taxa de reação	Lento	Alto	Baixo
A temperatura de reação	> 100 °C	60-80 °C	20-50 °C
Recuperação catalisador	Improvável	Difícil	Fácil
Reutilização do catalisador	Sem a capacidade de reutilização	Parcialmente	Reutilizável
Custo do catalisador	Baixo	Baixo	Alto
Geração de águas residuais	Alto	Alto	Baixo

\*AGL – Ácidos Graxos Livres

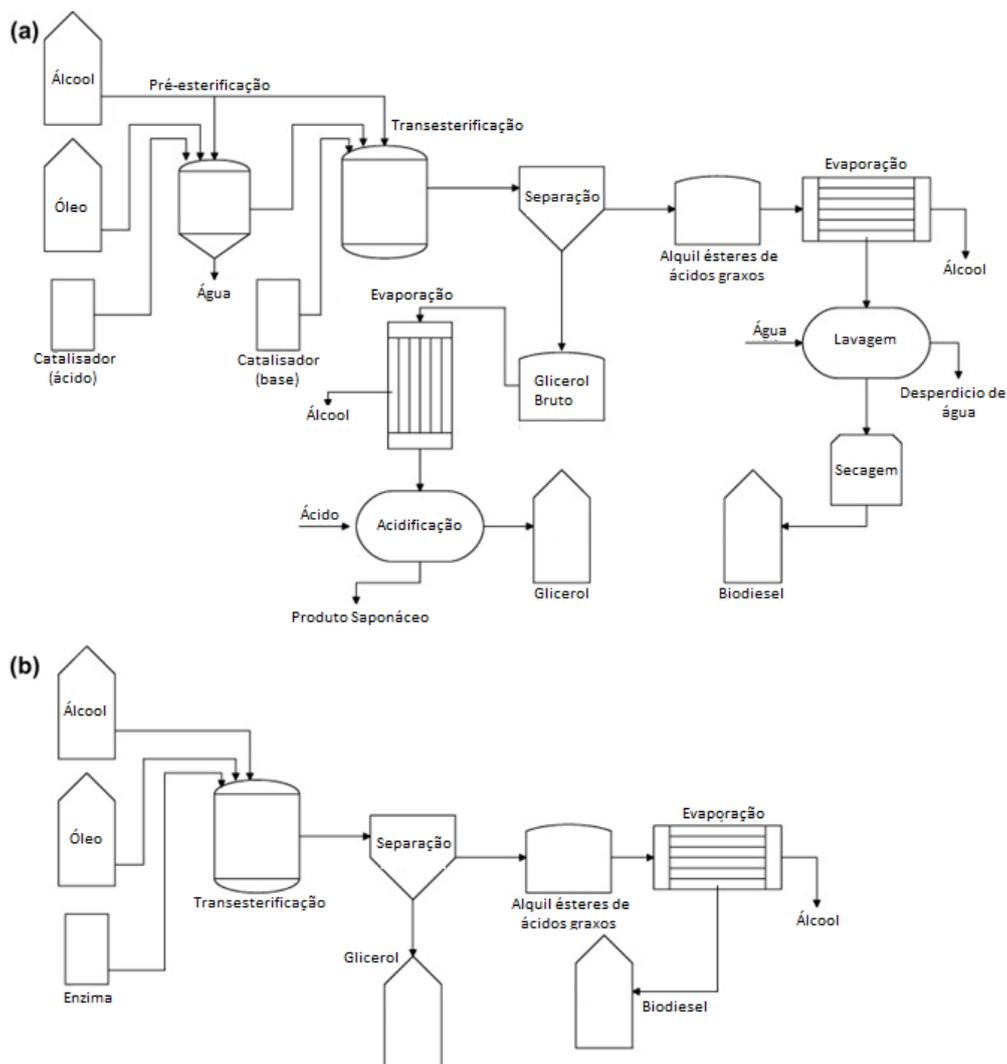
De um modo geral, o processo de transesterificação de um óleo vegetal ou animal (triglicerídeos) com a adição de um álcool, é capaz de gerar dois produtos: os alquil ésteres de ácidos graxos como produto principal e o glicerol como subproduto. Neste caso, há uma necessidade do auxílio de um catalisador (enzimático/químico) para acelerar o processo de reação (Bajaj *et al.*, 2010; Leung *et al.*, 2010; Aarthy *et al.*, 2014). Na Figura 1 está representado o esquema da transesterificação dos triglicerídeos.



**Figura 1** – Transesterificação de triglicerídeos (Aarthy *et al.*, 2014).

Outro processo na produção de biocombustíveis que vem demonstrando um forte potencial é o de transesterificação enzimática. Neste processo as enzimas agem em uma velocidade de  $10^3 - 10^7$  vezes mais rápidas, proporcionando uma redução da energia de ativação da reação, promovendo então uma diminuição do consumo de energia que envolve todo o processo. Neste processo utiliza-se enzimas imobilizadas a um determinado suporte sólido, proporcionando a reutilização das mesmas em vários ciclos reacionais (Fogler, 2012; Marum, 2013; Aarthy *et al.*, 2014; Guldhe *et al.*, 2015)

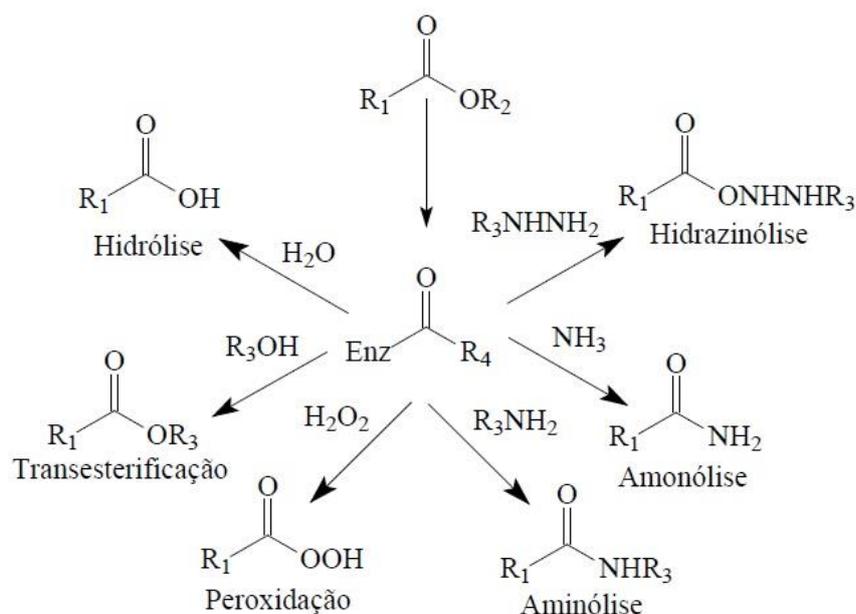
Observa-se na Figura 2 um esquema de operação da produção de biodiesel por transesterificação a partir da catálise química e enzimática. Com a eliminação das etapas presentes no processo convencional (por exemplo: a purificação e a separação) é possível tornar o processo mais sustentável e obter um produto final com alto grau de pureza, utilizando a catálise enzimática. (Medina *et al.*, 2009; Bajaj *et al.*, 2010; Aarthy *et al.*, 2014; Christopher *et al.*, 2014; Guldhe *et al.*, 2015).



**Figura 2** – Processo de produção de biodiesel a) etapas do processo químico b) etapas do processo enzimático (Adaptação de Christopher *et al.*, 2014).

As lipases são classificadas como Triglicerol acil-hidrolases (EC.3.1.1.3), pois através da reação de hidrólise elas são capazes de realizar a bioconversão de triglicerídeos em ácidos graxos livres (AGL) e glicerol. Além disso, as lipases são encontradas na natureza em grande quantidade, sendo possível ser obtidas através de fontes microbianas, animais e vegetais (Palomo *et al.*, 2005; Rodrigues, 2008; Bajaj *et al.*, 2010; Hama & Kondo, 2013; Aguietas *et al.*, 2015; Guldhe *et al.*, 2015; Manoel *et al.*, 2015; Poppe *et al.*, 2015).

Outra característica muito marcante das lipases é que sob condições brandas elas são capazes de catalisar outros tipos de reações. Em meio não aquoso, por exemplo, as lipases podem catalisar reações do tipo: esterificação, acidólise, aminólise, alcoólise, e reações de interesterificação (Figura 3) todas com um alto grau de especificidade e seletividade (Jaeger & Eggert, 2002; Aarthy *et al.*, 2014; Aguietas *et al.*, 2015; Guldhe *et al.*, 2015).



**Figura 3** – Diferentes reações catalisadas pelas lipases (Vlnieska, 2013).

Boa parte das enzimas aplicadas como biocatalisadores no processo de bioconversão de triglicerídeos são produzidas comercialmente. As mais utilizadas são de origem microbiana, tendo um destaque maior para a *Candida Rugosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus níger* e *Rhizomucor miehei* (Aarthy *et al.*, 2014; Aguietas *et al.*, 2015; Gudhe *et al.*, 2015).

O motivo pelo qual as lipases microbianas apresentam um enorme potencial no processo de transesterificação, é devido a sua estabilidade em solventes orgânicos, possuem uma grande especificidade em relação aos substratos e atuam em várias faixas de pH, principalmente valores mais altos (Aarthy *et al.*, 2014; Gudhe *et al.*, 2015).

Além disso, as lipases microbianas, principalmente as extracelulares possuem um peso molecular entre 19 – 60 KDa, operando em valores de pH

ligeiramente alcalino de 7,5 – 9, onde a atividade ótima atinge valores entre os intervalos de 35°C – 80°C (Aarthy *et al.*, 2014; Gudhe *et al.*, 2015).

Na Tabela 2, estão citadas algumas das principais lipases microbianas, utilizadas como biocatalisadores na produção de biodiesel, tendo como principal fonte óleos de origem vegetal, obtendo assim, rendimentos entre 35% - 100% num período reacional que leva de 1h – 100h.

Origem da Lipase	Substrato	R <sup>2</sup> (%)	Tempo (h)	T <sup>1</sup> (°C)	Referências
<i>R. oryzae</i>	Óleo de soja/metanol	80-90	60	35	Kaieda <i>et al.</i> , 1999
<i>R. oryzae</i>	Óleo de soja/NF	80	60	30	Tamalampudi <i>et al.</i> , 2008
<i>R. oryzae</i>	Óleo de soja/NF	80-85	72	35	Sun <i>et al.</i> , 2010
<i>R. oryzae</i>	Óleo usado/metanol	92	30	NF	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>R. oryzae</i>	Óleo usado/metanol	90	50	NF	Wang <i>et al.</i> , 2010
<i>R. oryzae</i>	Óleo usado/metanol	91,3	72	NF	Zhou <i>et al.</i> , 2014
<i>R. oryzae</i>	Óleo de palma/metanol	89	24	40-50	Talukder <i>et al.</i> , 2011
<i>R. oryzae</i>	Óleo de soja/metanol	91,1	70	35	Ban <i>et al.</i> , 2001
<i>R. oryzae</i>	Óleo de soja/metanol	90,9	50	NF	Hama <i>et al.</i> , 2007
<i>R. oryzae</i>	Calophyllum inophyllum/metanol	87	72	35	Arumugan & Ponnusami 2014
<i>R. oryzae</i> e <i>C. rugosa</i>	Óleo de canola	89,9	60	37	Jang <i>et al.</i> , 2012
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de girassol/metanol	92	12	50	Kumar <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de palma/metanol	100	40	40	Naranjo <i>et al.</i> , 2010
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de algodão/metanol	97	24	50	Royon <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida antarctica</i>	Óleo usado/metanol	89,1	4	50	Omar & Amin 2011

**Tabela 2** – Lipases utilizadas no processo de produção de biodiesel

<sup>1</sup>Temperatura utilizada no processo de produção

<sup>2</sup>Rendimento ésteres de ácidos graxo

Tabela 2 – Continuação

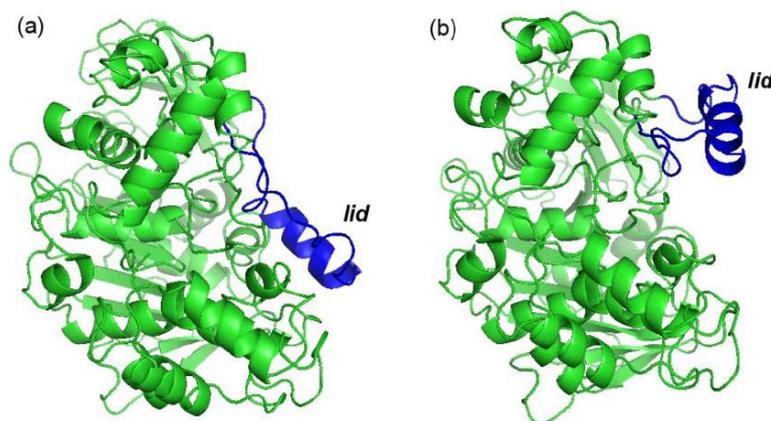
Origem da Lipase	Substrato	R <sup>2</sup> (%)	Tempo (h)	T <sup>1</sup> (°C)	Referências
<i>B. cepacia</i>	Sebo/etanol	65-100	10	NF	Da Rós <i>et al.</i> , 2012
<i>B. cepacia</i>	Óleo de babasu/etanol	100	48	NF	Da Rós <i>et al.</i> , 2014
<i>C. cylindracea</i>	Óleo de palma/metanol	83	8	37	Lara & Park 2004
<i>C. cylindracea</i>	Óleo de palma/etanol	90	8	37	
<i>C. cylindracea</i>	Óleo de palma/1propanol	92	8	37	
<i>C. cylindracea</i>	Óleo de palma/1butanol	94,6	8	37	
<i>F. heterosporum</i>	Óleo de colza/etanol	85	100	NF	Koda <i>et al.</i> , 2010
<i>Candida antarctica</i>	Óleo usado/propanol	95	0,83	40-45	Chakraborty <i>et al.</i> , 2010
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de palmiste/etanol	63	6	NF	Oliveira & Oliveira 2001
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de atum/etanol	95	40	NF	Shimada <i>et al.</i> , 2002
<i>Candida antarctica</i>	Óleo de soja/metanol	92	30	NF	Chen <i>et al.</i> , 2006
<i>Candida antarctica</i>	Óleo usado/metanol	39	4	NF	Gharat & Rathod 2013
<i>P. cepacia</i>	Óleo de soja/metanol	80	60		Kaieda <i>et al.</i> , 1999
<i>P. cepacia</i>	Óleo de soja/metanol	80	90	35	Kaieda <i>et al.</i> , 2001
<i>P. cepacia</i>	Óleo de soja/NF	90	24	30	Li <i>et al.</i> , 2011
<i>P. cepacia</i>	Óleo de coco/etanol	35	8	NF	Abigor <i>et al.</i> , 2000
<i>P. cepacia</i>	Óleo de soja/metanol	56	1	NF	Noureddini <i>et al.</i> , 2005
<i>P. cepacia</i>	Óleo de jatropha/etanol	98	16	50	Shah & Gupta 2007
<i>P. cepacia</i>	Óleo de Mahua/etanol	98	6	NF	Kumar <i>et al.</i> , 2007
<i>Candida rugosa</i>	Óleo de soja/metanol	87	30	35	Xie & Wang 2012
<i>Candida rugosa</i>	Óleo de soja/metanol	87	30	35	Xie & Wang 2012
<i>Candida rugosa</i>	Óleo de soja/metanol	97	3	NF	Kuo <i>et al.</i> , 2013
<i>T. lanuginosus</i>	Óleo de canola/NF	97	24	50	Dizge <i>et al.</i> , 2009
<i>R. mucilogenosa</i>	Azeite de dendê/NF	51	72	30	Serimhan <i>et al.</i> , 2011
<i>P. fluorescens</i>	Óleo de jatrofa/NF	72	48	40	Canakci 2007
<i>P. fluorescens</i>	Óleo de soja/metanol	80	100	35	Kaieda <i>et al.</i> , 2001
<i>R. miehei</i>	Óleo de soja/NF	92	6,3	36,5	Shieh <i>et al.</i> , 2003
<i>R. miehei</i>	Óleo de soja/metanol	70	72	NF	Huang <i>et al.</i> , 2012
<i>R. miehei</i>	Óleo de soja/metanol	66,3	72	44	Bergamasco <i>et al.</i> , 2013

<sup>1</sup>Temperatura utilizada no processo de produção

<sup>2</sup>Rendimento ésteres de ácidos graxos

Em geral, as estruturas das enzimas são formadas por até oito compostos do tipo folha  $\beta$ -pregueada, ligadas com até seis ligações de compostos  $\alpha$ -hélice (Aarthy *et al.*, 2014). O centro ativo é composto por uma tríade de aminoácidos serina, histidina e ácido aspártico, sendo esse os intermediários cruciais nas reações catalisadas pelas lipases (Aarthy *et al.*, 2014; Gudhe *et al.*, 2015; Manoel *et al.*, 2015; Poppe *et al.*, 2015).

Uma característica estrutural muito comum entre as lipases, é a presença de uma cadeia polipeptídica hidrofóbica no formato de  $\alpha$ -hélice recobrindo o seu centro ativo, sendo denominada de *tampa* ou *lid* (Figura 4). Quando essa estrutura entra em contato com a interface água/óleo, a mesma sofre uma alteração conformacional, expondo assim o sitio ativo ao meio reacional, tornando-o acessível ao substrato, dando a enzima uma conformação aberta. Mas quando não há uma interação interfacial, a tampa impede o acesso do substrato à tríade de aminoácidos, dando a enzima uma conformação fechada (Aarthy *et al.*, 2014; Gudhe *et al.*, 2015; Manoel *et al.*, 2015; Poppe *et al.*, 2015).

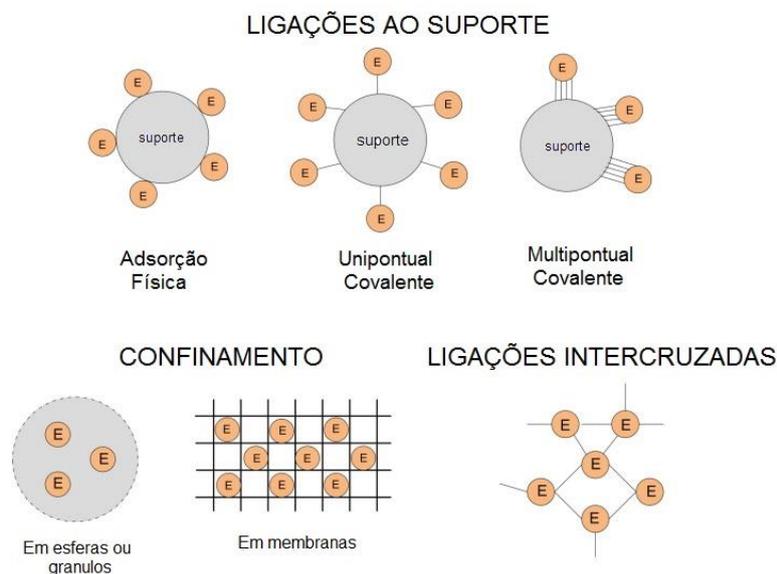


**Figura 4** – Conformação estrutural da lipase *Candida rugosa* a) Conformação fechada; b) conformação aberta (Rodrigues, 2009).

O mecanismo de atuação das lipases em reações de transesterificação é muito peculiar, através do centro ativo ocorre todo o processo de interação da enzima com o substrato. Além disso, essa relação só é possível graças a uma interação interfacial chamada de “óleo-água” (Aarthy *et al.*, 2014; Christopher *et al.*, 2014; Aguiéiras *et al.*, 2015; Gudhe *et al.*, 2015; Manoel *et al.*, 2015).

### 2.1.1 – IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

O principal objetivo em imobilizar uma enzima em um determinado suporte é obter um biocatalisador com um potencial catalítico melhorado em relação à enzima na sua forma livre. Como reportado em muitos trabalhos, existem várias maneiras e métodos para imobilizar uma enzima (Figura 5). Além disso a imobilização proporciona a facilidade na recuperação das enzimas e a reutilização das mesmas, pois a enzima fica insolúvel ao meio reacional (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2008; Tan *et al.*, 2010; Gudhe *et al.*, 2015; Poppe *et al.*, 2015).



**Figura 5** – Diferentes métodos para a imobilização (Poppe *et al.*, 2015).

Existem vários métodos que possibilitam imobilizar enzimas em um suporte polimérico. Se destacando no meio os seguintes métodos: adsorção, ligação covalente e encapsulação (Silva, 2007; Mendes 2011; Carvalho, 2012).

O método por adsorção é o mais simples e economicamente viável. O método baseia-se nas interações fracas entre a enzima e o suporte, ocasionadas por forças de Van der Waals (interações hidrofóbicas), ligações de hidrogênio e ligações iônicas. As vantagens encontradas por este método remetem num processo de imobilização mais simples de fácil execução e não ocasiona mudanças estruturais na cadeia enzimática, mas por outro lado, o processo

apresenta grandes variações na temperatura e no pH, ocasionando a desnaturização da enzima (Silva, 2007; Machado, 2008; Tan *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Carvalho, 2012; Zhão *et al.*, 2015).

Por encapsulação, a imobilização é ocasionada pela retenção física da enzima nas cavidades de uma matriz polimérica apresentando uma superfície alto nível de porosidade, possibilitando assim, uma maior quantidade de enzimas aprisionadas. Sua vantagem é a possibilidade de utilizar enzimas distintas num mesmo processo, pois apresenta uma maior área superficial para a imobilização. Mais este processo apresenta grandes desvantagens, como a utilização de um substrato com baixa massa molecular, utilização de alta concentração de enzima e na possível inativação da enzima durante o processo (Silva, 2007; Machado, 2008; Mendes *et al.*, 2011; Carvalho, 2012).

O método que tem despertado grande interesse nos últimos anos é o de ligação covalente, pois através da ativação do suporte por um agente bifuncional, faz com que os grupos reativos do mesmo fiquem favoráveis a fazerem ligações com os grupos nucleofílicos da enzima. Este método pode afetar a estrutura conformacional da enzima, impedindo que o seu sítio ativo entre em contato com o substrato (Silva, 2007; Tan *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Carvalho, 2012; Zhão *et al.*, 2015).

No entanto, o método por ligação covalente apresenta uma enorme variedade de vantagens, tais como: maior resistência do biocatalizador em relação as variações de temperatura, pH e substratos. Além disso, esses biocatalisadores podem ser usados em diversos tipos de reatores: como fluxo contínuo, empacotado, tanque agitado e leito fluidizado, pois a perda da carga da enzima permanece invariável após o processo de imobilização (Silva, 2007; Tan *et al.*, 2010; Mendes *et al.*, 2011; Carvalho, 2012; Zhão *et al.*, 2015).

Não é estabelecido um melhor método para imobilização das enzimas. Mas a seleção para a escolha do método de imobilização, irá depender dos seguintes fatores: atividade enzimática global, efetividade da utilização de lipase, desativação e características de regeneração, toxicidade dos reagentes utilizados e o custo e benefício do processo como um todo (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Mendes *et al.*, 2011). Na Tabela a seguir estão citados os diferentes

métodos de imobilização que podem ser aplicados no processo de transesterificação enzimática.

**Tabela 3** – Métodos de imobilização enzimática para a produção de biodiesel.

<b>Método de Imobilização</b>	<b>Lipase de Origem</b>	<b>Substrato</b>	<b>R(%)*</b>	<b>Ref.</b>
Adsorção	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo usado/metanol	92,8	Yagiz <i>et al.</i> , 2007
	<i>S. cerevisiae</i>	Óleo de oliva/etanol	81,3	Zeng <i>et al.</i> , 2009
	<i>Candida rugosa</i>	Óleo de algodão/metanol	98	Katiyar & Ali 2012
	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de algodão/metanol	97	Royon <i>et al.</i> , 2007
	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de jatropha/acetato de etila	91,3	Kumar <i>et al.</i> , 2007
	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de palma/isobutanol	100	
	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de palma/isopropanol	86	Naranjo <i>et al.</i> , 2010
	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de palma/ 1-butanol	77	
	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de colza/metanol	95	Li <i>et al.</i> , 2006
	<i>Candida antarctica</i>	Óleo de soja destilado/metanol	94	Wang <i>et al.</i> , 2006
	<i>Candida sp 99-125</i>	Óleo de soja destilado/metanol	96	Lu <i>et al.</i> , 2007
	<i>Candida sp 99-125</i>	Óleo de arroz/etanol	87,4	Li <i>et al.</i> , 2010
	<i>Penicillium expansum</i>	Óleo de milho/metanol	92,8	Li <i>et al.</i> , 2009
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de jatropha/etanol	98	Shah & Gupta 2007
	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Óleo de colza/n-butanol	94	Sakai <i>et al.</i> , 2010
	<i>Penicillium expansum</i>	Óleo de milho/metanol	92,8	Li <i>et al.</i> , 2009
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de girassol/etanol	91	Salis <i>et al.</i> , 2009	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de soja/metanol	96	Salis <i>et al.</i> , 2008	

\*Rendimento da reação de transesterificação.

Tabela 3 – Continuação

Método de Imobilização	Lipase de Origem	Substrato	R(%)*	Ref.
Adsorção	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Óleo de girassol/metanol	91	Soumanou & Bornscheuer 2003
	<i>R. miehei</i>	Óleo de girassol/metanol	>80	
	<i>Candida rugosa</i>	Óleo de oliva/NF*	76	Peng <i>et al.</i> , 2013
	<i>Candida rugosa</i>	p-NNP/NF*	74	
	<i>Candida sp 99-125</i>	Óleo vegetal/metanol	93	Nie <i>et al.</i> , 2006
	<i>Candida sp 99-125</i>	Óleo usado/metanol	92	
Encapsulação	<i>C. antarctica</i>	Óleo vegetal/metanol	90	Nassreddini <i>et al.</i> , 2008
	<i>P. cepacia</i>	Óleo de soja/metanol	67	Noureddini <i>et al.</i> , 2005
	<i>P. cepacia</i>	Óleo de soja/etanol	65	
Covalente	<i>R. miehei</i>	Óleo de soja/metanol	29	Poppe <i>et al.</i> , 2013
	<i>C. antarctica</i>	Óleo de soja/metanol	72	
	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Óleo de oliva/metanol	93	Yucel, 2011
	<i>C. rugosa</i>	Óleo de palma/metanol	70	Pirajar & Giraldo 2011
	<i>C. rugosa</i>	Óleo de palma/etanol	85	
	<i>C. rugosa</i>	Óleo de colza/metanol	95	Shão <i>et al.</i> , 2008
	<i>Termomyces lanuginosus</i>	Óleo de canola/metanol	97	Dizge <i>et al.</i> , 2009
	<i>C. antarctica B</i>	Óleo usado/metanol	89,1	Maceiras <i>et al.</i> , 2009
	<i>P. fluorescens</i>	Óleo de babaçu/etanol	70,2	
	<i>Burkholderia cepacia</i>	Óleo de babaçu/etanol	90,9	Freitas <i>et al.</i> , 2009
<i>C. antarctica B</i>	Óleo de babaçu/etanol	61,6		
<i>C. antarctica</i>	Óleo de soja/metanol	66	Há <i>et al.</i> , 2007	
<i>R. miehei</i>	Óleo de girassol/butanol	96	Dossat <i>et al.</i> , 2002	

\*Rendimento da reação de transesterificação.

A imobilização não é apenas uma maneira simples para separar a enzima a partir dos produtos de reação. Muitas vezes, o processo de imobilização altera as propriedades enzimáticas, produzindo biocatalisadores com atividade,

especificidade e estabilidade ao máximo ou até mesmo inibindo por completo sua atividade. Infelizmente não existe um processo de otimização para que esses parâmetros sejam corrigidos ou afetados (Dalla-Vecchia *et al.*, 2004; Hernandez *et al.*, 2011; Gudhe *et al.*, 2015; Poppe *et al.*, 2015).

A Tabela a seguir, cita as principais vantagens e desvantagens encontrados nos métodos mais utilizados na imobilização de enzima.

**Tabela 4** – Vantagens e desvantagens encontrados nos métodos de imobilização (Tan et al.2010).

<b>Métodos</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
Adsorção	As condições de preparo são leves e fáceis, tendo um baixo custo. O transportador pode ser regenerado para uso repetido.	A interação entre a lipase e o suporte é fraco, de modo que a lipase imobilizada fica sensível ao pH, força iônica e temperatura, etc. A capacidade de adsorção é pequena e a proteína pode ser removido do suporte.
Ligação covalente	A lipase imobilizada é bastante estável por causa das ligações fortes entre a proteína e o transportador.	As condições de preparação são rigorosas, de modo que a lipase pode perder a sua atividade durante o processo. Alguns reagentes de acoplamento são tóxicos.
Encapsulamento	As condições de encapsulação são moderadas, e o método de imobilização é aplicável a uma vasta gama de suporte e de lipases.	A lipase imobilizada tem sempre a restrição de transferência de massa durante o processo catalítico, de modo que a lipase é eficaz apenas para substratos de baixo peso molecular.

### 2.1.2 – INTRODUÇÃO DE ESPAÇADOR NA IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMA

Quando uma enzima é imobilizada diretamente na superfície de um determinado suporte polimérico, acontecerá um fenômeno de impedimento estérico, no qual acarretará na perda da atividade catalítica. Para evitar tal acontecimento, as moléculas de enzima devem ser afastadas a uma distância

da superfície do suporte. Neste caso usa-se um braço espaçador, por meio de um reagente bifuncional tal como: glutaraldeído, epícloridrina, carbodiimida, entre outros (Ozyilmaz, 2009; Arica *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013).

Em condições adequadas, o tipo apropriado do reagente bifuncional, afetará diretamente na influência da superfície sólida do suporte, além disso, proporcionará uma flexibilidade a enzima, fixando sua forma aberta (face interna da tampa), permitindo que a mesma apanhe mais facilmente o substrato (Lorente *et al.*, 2007; Lorente *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2013).

Oliveira e Vieira (2006) estudaram a imobilização da enzima peroxidase obtida do vegetal jiló (*Solanum gilo*), utilizando a quitosana como matriz polimérica, na fabricação de biossensores. O biopolímero inicialmente foi reticulado (glutaraldeído e epícloridrina) e posteriormente ativado (carbodiimida). Em seus resultados comprovaram a boa eficiência da quitosana como suporte para imobilização da peroxidase obtida do vegetal jiló. O bom desempenho desse biopolímero, foi obtido a partir da reticulação com glutaraldeído, epícloridrina e ativação com carbodiimida, onde permitiu a facilidade da construção, lhe conferiu uma alta estabilidade e baixo custo de operação.

Xie e Ma (2010) utilizaram em seu trabalho a Lipase (Lipozyme-TL) de *Thermomyces lanuginosa* imobilizada covalentemente em suporte sólido, onde o mesmo foi ativado com 1-etil 3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), com o intuito de catalisar a transesterificação de óleos vegetais com metanol, para produzir ésteres metílicos de ácidos graxos. A conversão máxima de 94% de ésteres metílicos, foi obtida utilizando apenas 40% da lipase imobilizada ao suporte ativado. Além disso, foi possível reutilizar o mesmo biocatalisador por 3 vezes sem a diminuição significativa da atividade.

Xie e Wang (2012) formularam microesferas de quitosana magnéticas preparadas pelo método de co-precipitação química usando o glutaraldeído como reagente de ativação para a imobilização da lipase (*Candida rugosa*). Usando a lipase imobilizada, no processo de transesterificação do óleo de soja em ésteres metílicos de ácidos graxos foi possível obter 87% de conversão sob a proporção 4:1 de metanol / óleo. Além disso, foi possível a reutilização do biocatalisador por mais 4 vezes sem a diminuição significativa da sua atividade.

Kuo *et al.* (2013) utilizaram nanopartículas de magnetitas revestidas com quitosana ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{QTS}$ ), para a imobilização covalente de lipase de *Cândida rugosa* utilizando *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida (EDC) e *N*-hidroxissuccinimida (NHS) como agentes de acoplamento. Com os resultados obtidos puderam considerar que o suporte formulado ( $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{quitosana}$ ) foi provado ser eficiente para o processo de imobilização da lipase, onde, puderam obter a atividade real da lipase imobilizada em torno de  $19,96 \pm 0,60$  L/g.

## 2.2 – POLISSACARÍDEOS COMO SUPORTE POLIMÉRICO DE ENZIMAS

A utilização de enzimas livres em processos de transesterificação possui limitações na sua reutilização e recuperação, por isso, vários pesquisadores vêm propondo a utilização de enzimas imobilizadas em um determinado suporte sólido. (Webb *et al.*, 1995; Nakao *et al.*, 1997; Li *et al.*, 2004).

Ao longo dos últimos anos, vários materiais poliméricos foram estudados com o propósito de formular um suporte para a imobilização de enzimas. Tendo como, o principal objetivo, o aprimoramento de suas características físicas e químicas através de modificações nas suas estruturas (Isgrove *et al.*, 2001).

A disponibilidade de suportes poliméricos é enorme, onde se destaca no meio os materiais naturais e os sintéticos. Levando em conta que os suportes poliméricos naturais têm demonstrado ser úteis no processo de imobilização, pois suas propriedades se adequam aos parâmetros de imobilização, possibilitando uma melhor interação entre enzima e o suporte (Kumar, 2007).

Além disso, o material polimérico a ser trabalhado como suporte, devem apresentar algumas características tais como: a disponibilidade, não tóxico e biocompatibilidade com a enzima, proporcionando, assim, uma grande área superficial adequada para a realização da atividade enzimática. Sabendo que, a estrutura do suporte e suas propriedades, tem um impacto enorme na estrutura enzimática, podendo afetar de forma direta o processo de imobilização (Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013).

Com tantas pesquisas existentes, a introdução desses suportes como biocatalisadores no processo industrial de transesterificação enzimática,

lamentavelmente ainda é muito limitada, levando em conta os processos de imobilização e a grande demanda na utilização de enzimas.

Em se tratando de suportes naturais, alguns polímeros como a celulose, a quitina, quitosana e o amido, se destacam por possuírem uma vasta disponibilidade, possuem um índice de biocompatibilidade com a enzima, são fáceis de serem modificados estruturalmente, pois os mesmos apresentam grupos funcionais capazes de melhorar a interação entre a enzima, e além de tudo são suportes biodegradáveis (Kumar, 2000; Li *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2013).

Esses suportes podem ser encontrados e manipulados nas suas formas físicas básicas, tais como: pó, gel, fibras, membranas ou em microcápsulas. Além disso, os suportes naturais apresentam grupos de aminoácidos em sua estrutura, onde, os mesmos são capazes de fornecer pontos de ligação para as proteínas, facilitando o método de imobilização. Essa característica faz com que os suportes naturais, sejam os mais utilizados no meio técnico e industrial (Gomes *et al.*, 2003).

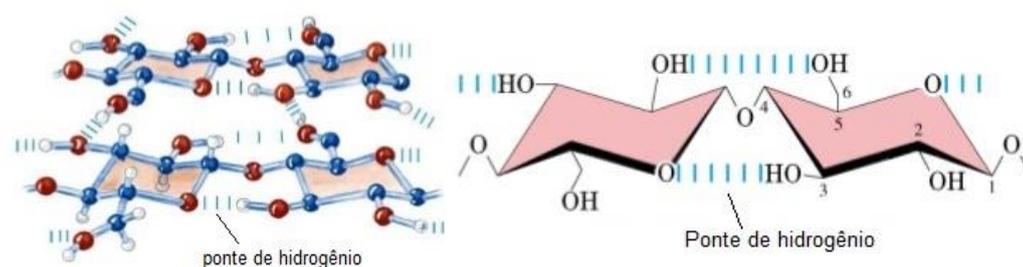
A escolha do suporte adequado dependerá do método de imobilização a ser aplicado, pois ambos irão influenciar diretamente na atividade e na estabilidade da enzima imobilizada. (Hung *et al.*, 2003).

Com a existência de uma grande diversidade de polissacarídeos apresentando diferentes formas estruturais e propriedades físicas bastante distintas, a formulação de novos biomateriais vem ganhando um destaque entre várias áreas industriais. Esse interesse se dá pelas características específicas que os polissacarídeos apresentam tais como: a biodegradabilidade, atividade biológica e a renovabilidade. Tais biomateriais possuem um vasto campo de aplicações, tendo o seu maior destaque no setor de biotecnologia (Eiras *et al.*, 2007; Rinaudo, 2008; Cunha *et al.*, 2009).

De um modo geral os polissacarídeos, conhecidos também como *glicanos* ou “polímeros naturais”, são formados por estruturas de monossacarídeos unidas por ligações glicosídicas, podendo ser classificados em dois grupos: os *homo polissacarídeos* – estruturas que possuem apenas um único

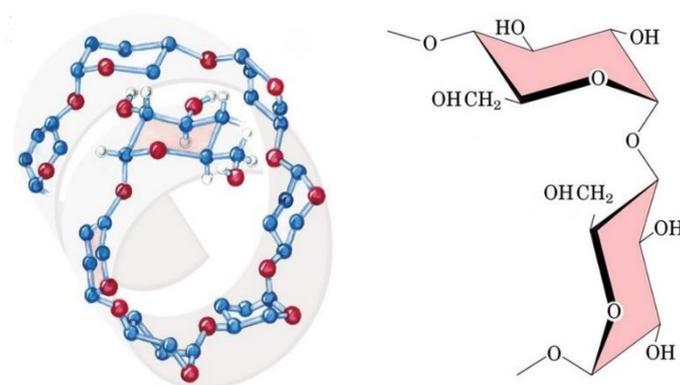
monossacarídeo ou os *heteropolissacarídeos* – apresentam dois ou mais monossacarídeos distintos ao longo da cadeia (Voet, 2000; Cunha *et al.*, 2009).

Os polissacarídeos podem ser encontrados nas estruturas celulares de plantas e animais, desempenhando um papel muito importante, pois sua função é garantir a integridade estrutural, fornecendo uma alta resistência mecânica através da formação de redes tridimensionais. Esses polissacarídeos são conhecidos como *estruturais* (Figura 6), tendo o maior destaque a Celulose, Quitina, Quitosana e seus derivados (Voet, 2000; Toneli *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2009).



**Figura 6** - Estrutura de um polissacarídeo estrutural.

Além disso, outros polissacarídeos, podem ser obtidos através da extração de sementes, caules, frutos, raízes e tubérculos. Sua principal função é atuar como um reservatório de energia para esses produtos vegetais. São denominados de *Polissacarídeos de Reserva* (Figura 7), tendo como principal destaque o amido e os galactomananos (Voet, 2000; Toneli *et al.*, 2005; Cunha *et al.*, 2009).

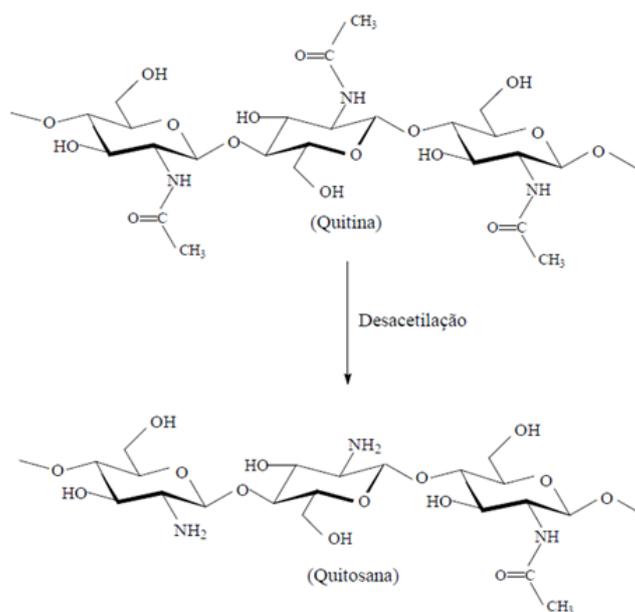


**Figura 7** – Estrutura de um polissacarídeo de reserva.

### 2.2.1– QUITOSANA COMO SUPORTE POLIMÉRICO

A quitosana é um polissacarídeo natural, onde sua estrutura linear é formada pelo composto das unidades de *N*-acetil *D* glucosamina e *D*-glucosamina, ambas ligadas por ligações glicosídicas  $\beta$  (1  $\rightarrow$  4) (Dutta *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Croisier & Jérôme, 2012; Balan & Verestiuc, 2014).

Embora sua obtenção natural a partir de algumas espécies de fungos ainda seja em pequena escala, a quitosana é obtida principalmente pela desacetilação da quitina (Figura 8) – um polímero natural encontrado nas carapaças de exoesqueletos de crustáceos (camarões, lagostas etc.) – sendo assim, a quitosana se torna o segundo polímero natural mais abundante da terra, ficando atrás da celulose (Barros *et al.*, 2006; Rinauldo 2006; Azevedo *et al.*, 2007; Laranjeira & Fávere, 2009; Shukla *et al.*, 2013; Balan & Verestiuc, 2014).



**Figura 8** – Processo de desacetilação da quitina em quitosana (Martins, 2008).

Como o processo de desacetilação não ocorre totalmente, a quitosana por sua vez é constituída por unidades desacetiladas e acetiladas. A essa característica é possível determinar o grau de desacetilação (GD – quantidade de monômeros desacetilados), que determinará qual será o polímero predominante e as características químicas e biológicas. Para o biopolímero

desacetilado ser considerado quitosana, seu valor em relação ao GD deverá ser superior a 60% (Dutta *et al.*, 2004; Barros *et al.*, 2006; Azevedo *et al.*, 2007; Abdelaal *et al.*, 2014; Balan & Verestiuc, 2014).

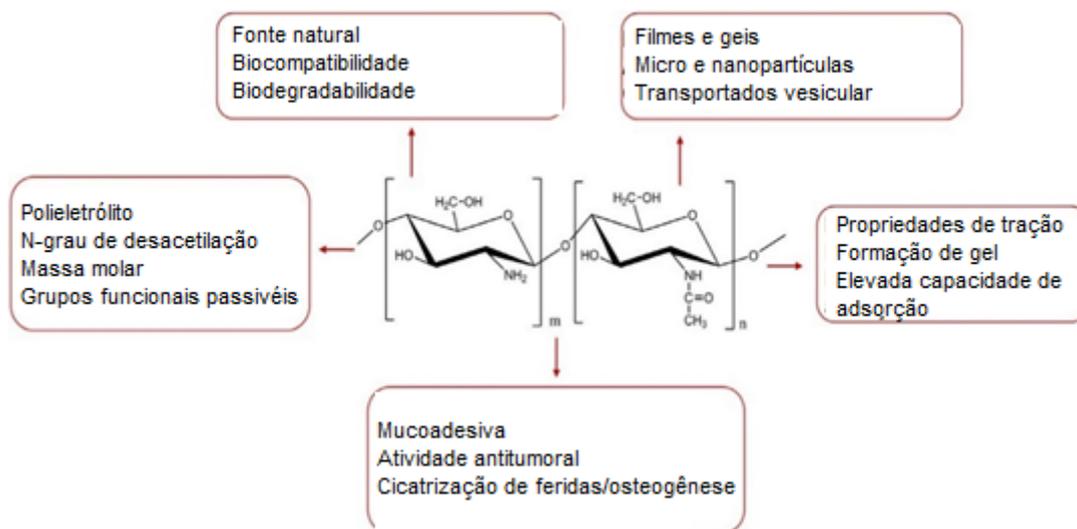
Azevedo e seus colaboradores citam em seu trabalho, alguns fatores primordiais, capazes de interferir tanto no processo de desacetilação da quitina em quitosana, como nas características do polímero obtido:

- Temperatura e tempo da reação
- Concentração da solução de álcali e adição de diluente
- Razão quitina/álcali
- Característica física do polímero (tamanho das partículas de quitina)
- Atmosfera da reação e agentes externos que evitam a despolimerização

Um aspecto importante que diz respeito a quitosana está relacionado a sua solubilidade, pois ela é insolúvel em água, sendo capaz de ser solubilizada em soluções ácidas com o pH inferior a 6. A essa característica se dá pela protonação dos grupos amino (monômero *D*-glucosamina) presentes em sua cadeia (Laranjeira & Fávere. 2009; Croisier & Jérôme, 2012).

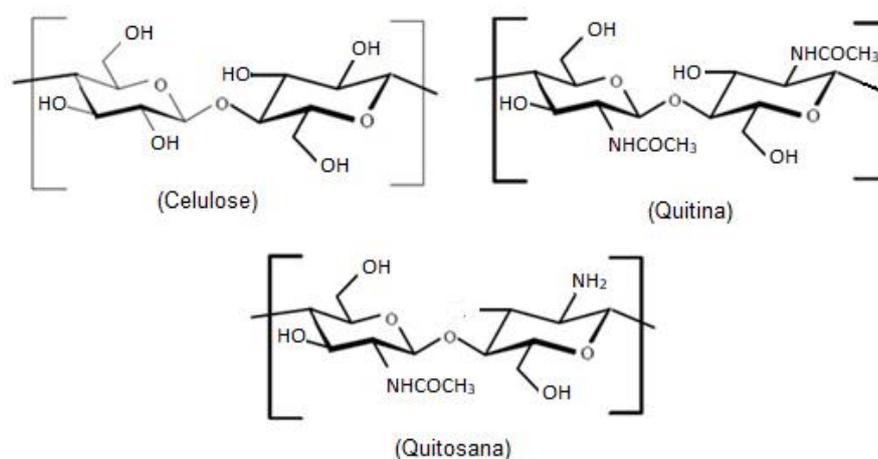
A quitosana é ainda um ótimo biomaterial, pois sua alta hidrofiliabilidade pela presença dos grupos hidroxila e amino presentes na sua estrutura, permite que o polímero seja modificado fisicamente, possibilitando o manuseio nas formas de microcápsulas, pó, nanopartículas, membranas, flocos, fibras e esponjas (Gonsalves *et al.*, 2011; Shukla *et al.*, 2013).

Através dessas características, a quitosana assume uma alta versatilidade, capaz de ser aplicada em várias áreas tecnológicas e estudos, tais como: veículo de liberação de fármacos, bandagens, géis injetáveis, membranas periodontais, suportes para imobilização de enzimas, tratamento de poluentes de água e entre outros (Figura 9) (Torres *et al.*, 2005; Laranjeira & Fávere. 2009; Croisier & Jérôme, 2012).



**Figura 9** – Biocompatibilidade e versatilidade da quitosana (Adaptação de Balan & Verestiuc, 2014).

A estrutura molecular da quitosana é quimicamente semelhante à da quitina e da celulose (Figura 10), diferenciando-se apenas pelos grupos funcionais presentes na cadeia. Onde na celulose o grupo funcional predominante é a hidroxila (-OH), para a quitina o seu grupo funcional é o *N*-Acetil (NCOCH<sub>3</sub>), no caso da quitosana o grupo amino (-NH<sub>2</sub>) é o grupo funcional principal (Azevedo *et al.*, 2007; Abdelaal *et al.*, 2014).

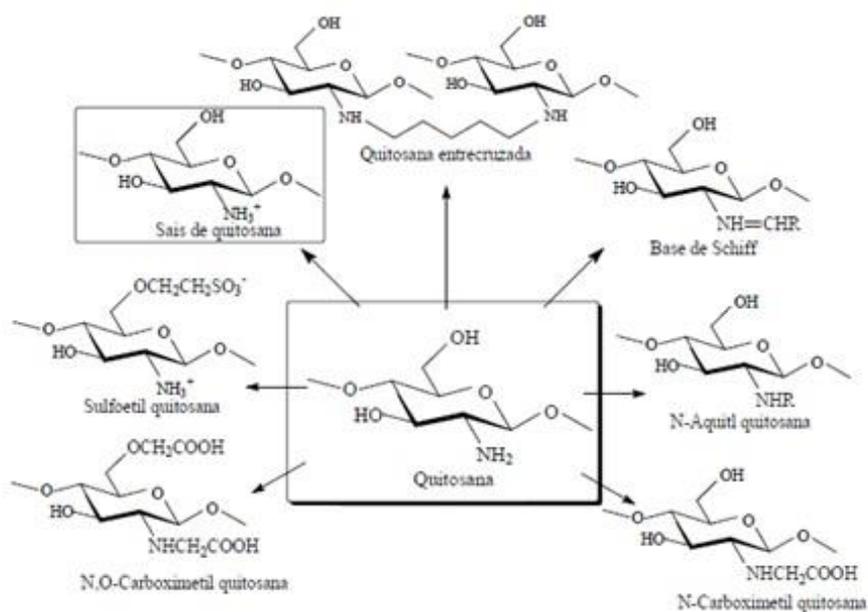


**Figura 10** – Estrutura química da celulose, quitina e quitosana (Martins 2008).

### 2.2.1.1 – MODIFICAÇÃO DOS GRUPOS HIDROXILA DA QUITOSANA COM CARBODIIMIDA

Dentre várias características citadas anteriormente, em relação a quitosana, um outro aspecto muito importante em relação a este polímero, é a possibilidade de realizar modificações na sua estrutura (Torres *et al.*, 2005). Por essa razão a quitosana vem ganhando um forte interesse no setor biotecnológico. Na Figura 11 observa-se alguns exemplos dos derivados da quitosana, obtidos a partir da modificação química em sua estrutura.

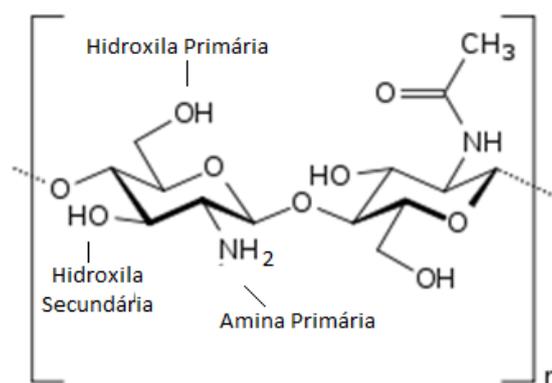
Com uma presença maior dos grupos amino reativos, a quitosana torna-se um polímero facilmente modificado por outros materiais, através dos métodos de ligação covalente, montagem de camada por camada, tratamento de plasma, modificações químicas e por enxerto de revestimentos (Hong *et al.*, 2005; Lao *et al.*, 2008; Ye *et al.*, 2008; Davarpanah *et al.*, 2009; Peng *et al.*, 2012). Levando em conta que para o desenvolvimento de um suporte para a imobilização de enzima, o que mais se relata na literatura é a utilização do método de ligação covalente.



**Figura 11** – Derivados da quitosana (Adaptação de Martins, 2008).

Todas essas modificações realizadas no biopolímero, tem como objetivo, melhorar as propriedades superficiais da quitosana, que estão relacionadas com a morfologia, hidrofiliabilidade e composição química. Proporcionando então, um ambiente favorável na interação entre a enzima e o transportador (Tian *et al.*, 2008).

O principal alvo de modificações na quitosana estão ligados diretamente aos seus grupos funcionais: a hidroxila (-OH) e amino (-NH<sub>2</sub>) (Dockal *et al.*, 2003; Mourya & Inamdar 2008) (Figura 12).



**Figura 12** – Representação dos grupos funcionais da quitosana (Adaptado de Mourya & Inamdar 2008).

Essas reações são realizadas através de agentes bifuncionais, tais como: glutaraldeído, epícloridrina, carbodiimida, tripolifosfato entre outros. São agentes capazes de realizar ligações cruzadas entre as cadeias da quitosana – método de reticulação – tornando o polímero mais rígido, insolúvel em alguns ácidos e aumentando sua estabilidade térmica. Entretanto, em alguns casos, esses agentes são capazes de modificar apenas a superfície do polímero – alterando principalmente seu caráter hidrofílico/hidrofóbico – ou até mesmo servindo de um braço extensor para a imobilização de enzimas, utilizando-o como um suporte polimérico (Rinaudo, 2006; Gonsalves *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013).

Torres *et al.* (2005) formularam esferas de quitosana reticuladas com epícloridrina, glutaraldeído e acetiladas, com o objetivo de estudar o grau de desacetilação e as resistências mecânica, química e térmica. A modificação não alterou as propriedades mecânicas e térmica das esferas, exceto para as microesferas reticuladas com glutaraldeído, que a partir de 0,15mol teve sua

estrutura comprometida, devido a sua baixa retenção de água. Entretanto as microesferas reticuladas com epícloridrina e glutaraldeído tiveram um aumento da resistência química em solução aquosa de HCl.

Laus *et al.* (2006) utilizaram em seu trabalho microesferas de quitosana reticulas com tripolifosfato com o objetivo de remover ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas, a fim de diminuir sua acidez. Com a análise térmica (TGA) foi possível verificar modificações na estabilidade térmica do polímero ocasionados pelo processo de reticulação. Utilizando a técnica de Infravermelho (FTIV) observou que a modificação ocorreu por uma interação iônica com os grupos amino protonado ( $-\text{NH}_3^+$ ) da quitosana, evidenciado pelo sinal em  $1552\text{cm}^{-1}$ .

Lima *et al.* (2006) modificaram quimicamente a quitosana  $\alpha$  com anidrido succínico, tendo como objetivo a adsorção do corante azul de metileno usado em indústrias têxteis. Tais resultados foram comparados com o carvão ativo, adsorvente tradicionalmente utilizado. Os ensaios mostraram que 97% da quantidade do corante foi adsorvido no suporte de quitosana, enquanto que no carvão ativado só 42% foi adsorvido.

Cerqueira *et al.* (2011) utilizou em seu trabalho filmes de quitosana modificados com glicerol (plastificante), com o objetivo de determinar o efeito de recobrimentos comestíveis de proteínas e de quitosana na conservação de goiabas 'Kumagai'. De modo geral, todos os filmes tiveram uma boa aderência às frutas, conferindo um brilho e sem nenhuma descamação, fazendo com que houvesse um prolongamento no processo de amadurecimento dos frutos.

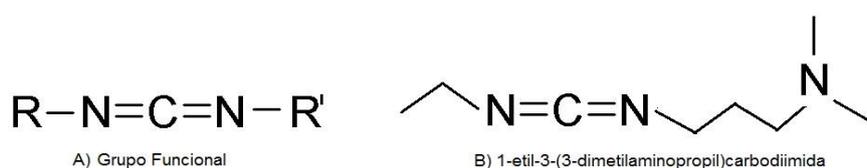
Marum *et al.* (2014) formularam microesferas de quitosana com núcleo magnético, modificadas com epícloridrina, tendo como objetivo a formulação de um suporte para a imobilização de enzimas a serem incluídas como biocatalizador. Os experimentos realizados através da atividade enzimática, mostraram que os suportes modificados, possuem potencial de imobilização (25601 U/g), em comparação com a atividade da enzima imobilizada no suporte sem modificação (11590 U/g).

Wu *et al.* (2011) formularam microesferas de quitosana reticuladas com genipina e carregadas com fator de crescimento transformante- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

utilizando o método de emulsificação, onde as mesmas foram selecionadas e incorporadas em matrizes porosas construídas por quitosana-policaprolactona com um teor de policaprolactona de cerca de 42%. Os suportes de quitosano-policaprolactona com porosidade superior a 80% e com uma carga de TGF- $\beta$ 1 inicial de cerca de 3 mg (TGF- $\beta$ 1) / mg (suporte seco) foram capazes de manter a liberação sustentada de TGF- $\beta$ 1 em uma simulação *in vivo*, obtendo assim, taxas controladas ao longo de um período de tempo de quatro semanas sem ruptura gravemente inicial.

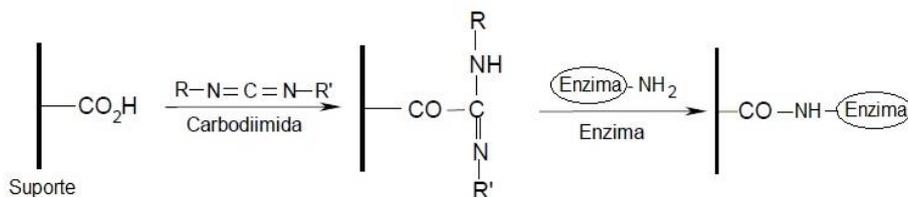
Como mostrado anteriormente, diferentes métodos são utilizados para modificar quimicamente a quitosana, com intuito de aprimorar suas propriedades físicas e químicas – tais como: biocompatibilidade, molhabilidade e funcionalidade para aplicações biológicas – ressaltando que para cada aplicabilidade dependerá do método a ser utilizado (Torres *et al.*, 2005; Lima *et al.*, 2006; Gonsalves *et al.*, 2011; Dorraki *et al.*, 2015).

O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Figura 13), é um agente bifuncional solúvel em água e estudos descobriram que ele possui uma ótima biocompatibilidade em relação aos reagentes mais utilizados no processo de imobilização (Wang *et al.*, 2003; Sheffel *et al.* 2013).



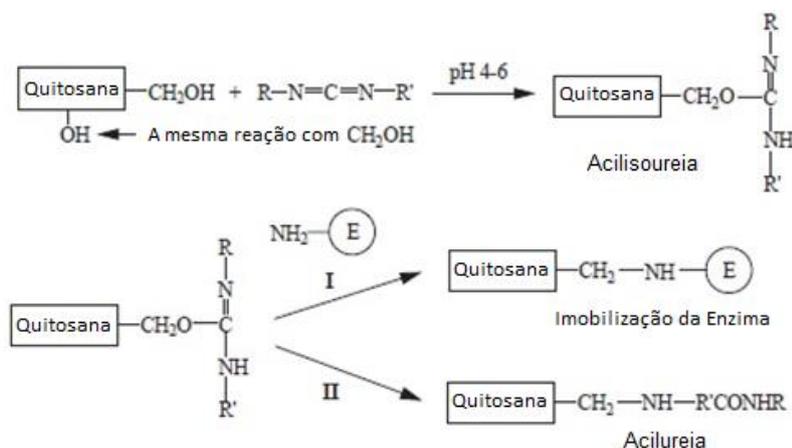
**Figura 13** – Estrutura química A) grupo funcional da carbodiimida B) EDC – isômero da carbodiimida.

O primeiro relato da sua aplicabilidade foi como agente de ativação de um suporte para produzir ligações amídicas, através de aminas primárias. Além disso, o EDC pode ser utilizado tanto na reticulação de estruturas poliméricas como um agente ativador de suportes para a imobilização de enzimas (Figura 14) (Timkovich, 1977; Oliveira & Vieira, 2006; Santana *et al.*, 2012; Sheffel *et al.*, 2013; Ashjari *et al.*, 2015).



**Figura 14** – Esquema da imobilização de enzima em um suporte carboxilado (de Oliveira e Vieira, 2007).

Chiou & Wu (2004) desenvolveram uma ilustração hipotética de como seria a imobilização da lipase *Candida rugosa* em um suporte de quitosana (Figura 15), usando o método de ativação com EDC na faixa de pH 4,0-6,0, como demonstrado na Figura a seguir.



**Figura 15** – Esquema da ativação dos grupos hidroxila da quitosana com o agente EDC (Chiou & Wu; 2004).

A ativação dos grupos hidroxila da quitosana usando EDC, se dá pela formação de um complexo muito instável, a acilisoureia. Posteriormente no processo de imobilização, esse complexo entra em contato com grupo amino da enzima, a fim de formar a ligação de imobilização com o suporte ativado (produto I). Mas, por outro lado, no momento do processo pode acontecer um rearranjo das estruturas, fazendo com que haja a formação de um outro produto, a acilureia (produto II). Neste caso não haverá a imobilização enzimática (Chiou & Wu; 2004).

A partir da técnica Espectroscopia de electrónica para análise química (ESCA), Chiou e seus colaboradores confirmarão a ativação dos grupos

hidroxilas com EDC. A porcentagem dos átomos de carbono e nitrogênio na superfície da quitosana, iram aumentar de acordo com o aumento da concentração de EDC. Em seus resultados, o carbono teve um aumento significativo (47,5 – 58,4%) em relação ao nitrogênio (7,1 – 8,5%), levando em conta a mudança da concentração de EDC (0 – 1%). Isso tudo indica que, com um aumento do número de átomos de carbono presentes na molécula de EDC, os resultados demonstram a capacidade do mesmo se ligar na superfície do polímero através da ativação.

### 2.3 – ATIVIDADE ENZIMÁTICA NO PROCESSO DE TRANSESTERIFICAÇÃO

No processo de transesterificação, a catálise enzimática utilizando metanol, ocorre em três passos, no qual o primeiro passo os triglicerídeos são convertidos em diglicerídeos. No segundo passo, acontece a conversão dos diglicerídeos em monoglicerídeos. No terceiro e último passo as moléculas de monoglicerídeos são convertidas em glicerol (Shah *et al.*, 2003; Turkan & Kalay, 2006; Ghaly *et al.*, 2010; Guldhe *et al.*, 2015).

Em cada momento das conversões é produzido uma molécula de éster de ácido graxo (FAME), isso quer dizer, que em uma reação de transesterificação enzimática uma molécula de triglicerídeo é capaz de produzir 3 moléculas de FAME (Shah *et al.*, 2003; Turkan & Kalay, 2006; Ghaly *et al.*, 2010; Guldhe *et al.*, 2015).

A catalise enzimática se baseia no modelo Ping-Pong BiBi, atualmente sendo o mais utilizado nos processos de transesterificação, baseando-se em uma reação global. Neste caso, a reação acontece a partir da interação de dois substratos, dando origem a dois produtos, isso acontece graças a formação do intermediário enzima-substrato (Ghaly *et al.*, 2010; Pessoa *et al.*, 2010; Guldhe *et al.*, 2015).

Neste modelo, dois grupos localizados no centro ativo da enzima, desempenham papéis importantes na cinética enzimática, o primeiro é o grupo hidroxila da serina que atua como um nucleófilo, o outro é o átomo de nitrogênio

da histidina que participa no processo de mobilização de próton (Ghaly *et al.*, 2010; Pessoa *et al.*, 2010; Guldhe *et al.*, 2015).

Um outro modelo que vem sendo pesquisado em estudos é o modelo de Michaelis-Menten, onde o  $K_m$  determina a afinidade da enzima com o substrato e o  $V_{max}$  a taxa máxima da reação. A afinidade de uma enzima para como o substrato será elevada quando o valor de  $K_m$  for baixo (Leca *et al.*, 2010; Guldhe *et al.*, 2015).

Ranjbakhsh e seus colaboradores, estudaram a cinética da catálise enzimática da enzima *Porcina pancreática* (PPL) imobilizadas em nanopartículas de magnetita ( $Fe_3O_4$ ) revestidas com sílica. A otimização do processo seguiu o modelo proposto por Michaelis-Menten, onde os resultados obtidos foram comparados entre a PPL imobilizada e a PPL na sua forma livre, utilizando p-NPP como substrato. O resultado de  $K_m$  mostrou que para a lipase imobilizada (0,123 mmol) foi menor do que a da lipase livre (0,312 mmol), comprovando então, que a lipase imobilizada houve uma maior afinidade com o substrato. Este aumento pode estar relacionado com a indução de uma modificação conformacional na estrutura da enzima devido a imobilização.

### 2.5.1 – PARAMENTROS QUE AFETAM A CINÉTICA ENZIMÁTICA

Assim como em qualquer outro processo, a catalise enzimática apresenta alguns fatores que podem influenciar tanto no rendimento da reação como na eficiência do processo. Tais fatores são: a natureza e as propriedades do biocatalisador, os métodos de imobilização; pré-tratamentos enzimáticos; substratos do biodiesel; aceitadores de acilo, o uso de solventes; condições de funcionamento da catálise enzimática; e o modelo do biorreator (Leca *et al.*, 2010; Guldhe *et al.*, 2015).

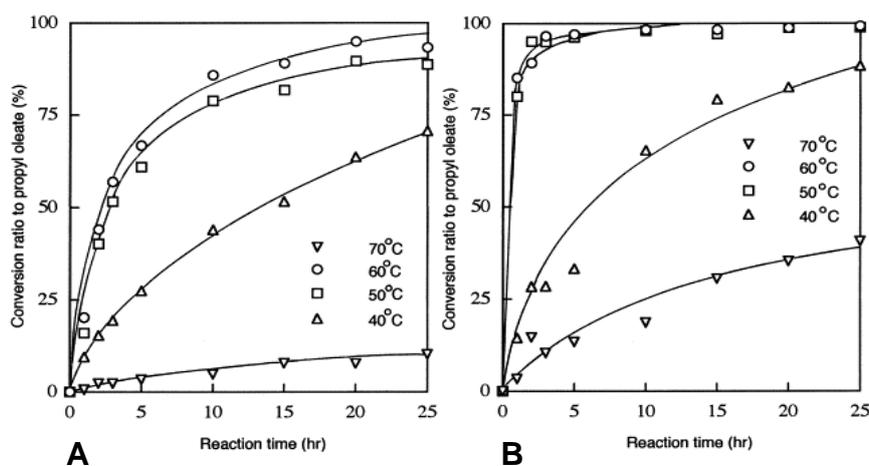
Entretanto, neste trabalho, apenas a temperatura e o pH do meio reacional, serão investigados, para determinar o efeito dessas variáveis na atividade enzimática durante o processo de transesterificação da enzima livre e imobilizada.

### 2.3.1.1 – TEMPERATURA DO PROCESSO

Usualmente as reações de transesterificação enzimática acontece em temperaturas mais baixas, em relação aos processos convencionais (transesterificação química). Esse parâmetro é estabelecido entre valores que variam de 20°C a 70°C. Assim, proporcionando a reação dentro desta faixa de temperatura, permite obter um ambiente propício para a atividade; não havendo a desnaturação da enzima (Guldhe *et al.*, 2015).

Em vários estudos estão sendo relatados que a faixa de temperatura ótima da atuação da enzima em processos de transesterificação enzimática, está entre 50°C a 70°C, obtendo assim, um maior rendimento do biodiesel. Embora sabemos que em temperatura ambiente também é possível ocorrer a reação produzindo um bom rendimento (Meng *et al.*, 2008; Yaakob *et al.*, 2013).

Iso *et al.* (2001) investigaram a atividade da enzima Amano AK *Pseudomonas fluorescens* (PF) imobilizada em partículas porosas de caulinite e também na sua forma livre. A reação transesterificação ocorreu nas seguintes faixas de temperatura: 40°C a 70°C para ambos os casos. A atividade catalítica da enzima teve um aumento considerável na faixa de 50 – 60°C para a enzima imobilizada e na sua forma livre. Ressaltando que, o rendimento da conversão foi maior para a PF imobilizada. Já em temperaturas mais elevadas, houve uma diminuição significativa da atividade (Figura 16).



**Figura 16** – Efeito da temperatura no processo de transesterificação A) PF livre B) PF imobilizada (Iso *et al.*, 2001).

Bussamara *et al.* (2009) estudaram a influência da estabilidade térmica, no processo de transesterificação da enzima *Pseudozyma hubeiensis* imobilizada e na sua forma livre. Em seus resultados foi possível comprovar que para ambos os casos a temperatura ótima para o processo, foi estabelecido a 50°C, apresentando uma atividade residual de 227% para a enzima imobilizada e 85% para a lipase livre. Afirmando que em temperaturas mais elevadas houve uma diminuição na atividade residual de ambas as lipases.

Xie & Wang (2012) estudaram a transesterificação do óleo de soja com metanol, tendo como catalisador a lipase de *Candida rugosa* imobilizada em um suporte de quitosana. Os resultados obtidos através das atividades catalíticas da lipase imobilizada, foram investigadas num intervalo de temperatura de 25 a 45°C. A conversão máxima foi obtida com o aumento da temperatura de reação quando atingiu 35°C. No entanto, houve uma queda gradativamente da atividade, quando a temperatura foi aumentando até atingir o valor final de 45°C. Assim, a temperatura ótima encontrada neste trabalho foi de 35°C.

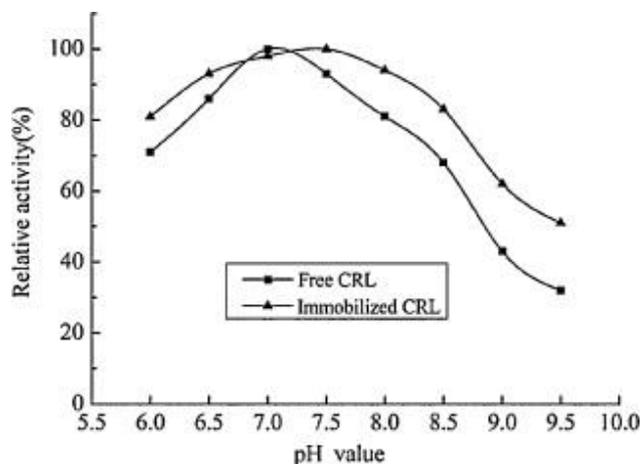
#### 2.3.1.2 – pH DO MEIO REACIONAL

O pH do meio reacional é um dos principais fatores que influenciam na reação de transesterificação. Este fator afeta diretamente a conformação da cadeia da lipase, no ato do processo de imobilização. O pH ótimo para uma reação de transesterificação enzimática, está ligeiramente deslocado para valores mais alcalinos, pois nesta faixa há uma alta interação parcial com o centro ativo da enzima, facilitando a abertura da tampa (Aloulou *et al.*, 2007; Athalye *et al.*, 2013; Christopher *et al.*, 2014).

Lipases que tem a origem bacteriana atuam em um pH ótimo consideravelmente alcalino (7 – 9). Já as de origem de levedura e fungos atuam em pH neutro a ligeiramente ácido. Normalmente existem lipases que atuam em pH mais alcalino, operando assim, em valores entre 3 -12 (Aloulou *et al.*, 2007; Athalye *et al.*, 2013; Christopher *et al.*, 2014).

Yong *et al.* (2008) utilizaram a lipase *Candida rugosa* imobilizada em um suporte magnético revestido com um copolímero, com o objetivo de investigar o

efeito do pH sobre a atividade da enzima imobilizada e livre. O efeito do pH sobre a atividade das amostras de lipase livre e imobilizada foi investigada na faixa de pH 6,0-9,5 a 37°C, e os resultados são apresentados na Figura 17.



**Figura 17** – Efeito do pH sobre a atividade (Yong *et al.*, 2008).

Observaram que o pH óptimo da enzima livre foi de 7, enquanto que para a enzima imobilizada essa faixa foi deslocada para 7,5. Esses resultados poderiam provavelmente ser atribuídos à estabilização das moléculas de lipase resultantes da fixação multiponto sobre a superfície das microesferas magnéticas hidrofílicas por ligações covalentes, que limitaram a transição da conformação enzimática contra a variação do pH.

Chiou *et al.* (2004) estudaram os efeitos do pH sobre a imobilização da lipase *Candida rugosa* em esferas de quitosana ativadas com carbodiimida, através da atividade e a atividade relativa (RSA). Para a avaliação das análises, utilizaram valores de pH na faixa de 5 – 11. Em seus resultados, o pH ótimo da lipase imobilizada e na forma livre foi obtido a partir do valor 6. Tais valores encontrados estão representados na Tabela 5.

**Tabela 5** – Otimização do valor do pH na catalise enzimática.

pH	Carregadas de proteína (g / g-quitosano)		Atividade (U / g-quitosana)		RSA (%)	
	Seca	Molhado	Seca	Molhado	Seca	Molhado
5	68	96	0,95	2,87	48,9	104,6
6	71	109	0,98	3,28	48,3	105,3
7	62	79	0,84	2,34	47,4	103,7
8	51	62	0,43	1,47	29,5	83,0
9	38	51	0,23	0,87	21,2	59,7
10	25	31	0,12	0,26	16,8	29,4
11	14	20	0,05	0,12	12,5	21,0
Livre	92,4 <sup>a</sup>		2,64 <sup>b</sup>		100	

<sup>a</sup> Teor de lipase livre ( $\mu\text{g/mL}$ ) / <sup>b</sup> Dimensão U/g

Esses e outros fatores são cruciais no processo da imobilização e na atividade enzimática, uma vez que os mesmos podem aumentar a interação enzima/suporte e o rendimento na produção do biodiesel. Não havendo um protocolo a ser seguido, há necessidade de se otimizar todo o processo, evitando erros que possam levar a desnaturação da enzima ou a diminuição da atividade.

### 2.3.1.3 – MODIFICAÇÃO DO GRAU DE HIDROFILICIDADE

Como mencionado anteriormente, a quitosana é um polímero natural, biodegradável, não-tóxico e extremamente abundante, tornando-se um polímero altamente atrativo, principalmente na área de biotecnologia como suporte polimérico (Marum *et al.*, 2014).

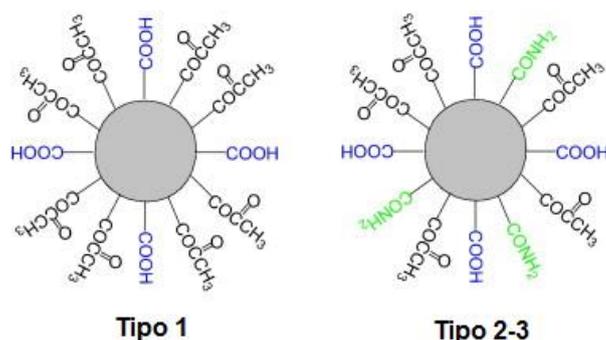
Uma vez formulado o suporte, surge uma característica limitante ao seu emprego, sua hidrofiliabilidade. Com a predominância dos grupos amino (N-H) na formação da sua cadeia por ligações covalentes, a quitosana é favorável ao surgimento de ligações eletronegativas, gerando sítios com uma alta polaridade, fazendo com que haja um rearranjo das moléculas de água ao redor desses sítios (Assis *et al.*, 2003).

Como a desacetilação da quitina em quitosana não é completa, apresentando ao longo da cadeia polimérica grupos acetamidos, que por sua vez

são polares. Com isso a quitosana é caracterizada como um material hidrofílico, com um alto grau de afinidade a retenção de água (Assis & Silva, 2003).

Basta fazer algumas mudanças nos grupos funcionais da quitosana para que sua hidrofilicidade mude. Ao modificar a quitosana atacando o grupo hidroxila (-OH) do polímero, seu comportamento será mais hidrofóbico, ao invés disso se o alvo da modificação for os grupos amino (-NH<sub>2</sub>), a quitosana então, irá assumir um comportamento mais hidrofílico (Zhang *et al.*, 2012).

Zhang *et al.* (2012) utilizam em seu trabalho microesferas magnéticas de acrilamida (AM) como suporte para imobilização de enzimas. Afim de averiguar o efeito das propriedades de superfície das microesferas, foram utilizadas séries de microesferas com diferentes características superficiais hidrofóbicas/hidrofílicas (ajustando percentagens molares de diferentes monômeros) (Figura 18).

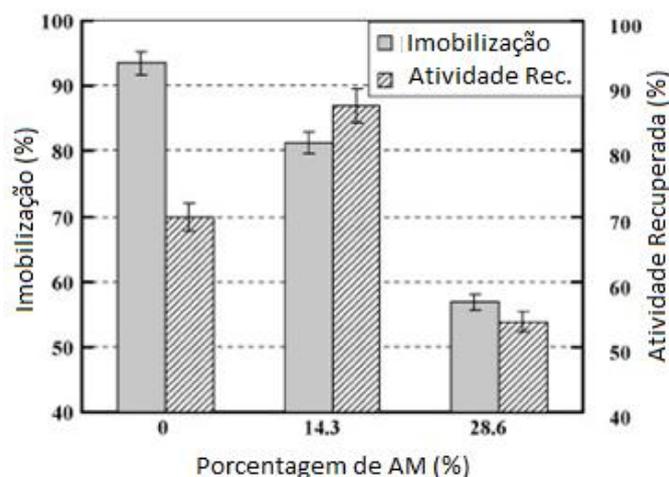


**Figura 18** – A estrutura da superfície de diferentes microesferas. (Adaptação de Zhang *et al.*, 2012).

Os resultados mostraram que as microesferas com superfícies modificadas, apresentaram comportamentos diferentes em relação a eficiência da imobilização e da reação de recuperação da atividade (Figura 19).

Na microesfera do tipo 1, onde a superfície era formada por monômeros de acetato de vinila (VCA), a porcentagem de lipase imobilizada foi a mais elevada, cerca de 94%. Com o aumento do monômero de acrilamida (AM) (tipos 2-3), a porcentagem de imobilização foi diminuindo gradativamente. Quando a porcentagem molar de AM foi aumentada para 28,6% (Tipo 3), observa-se uma

diminuição significativa na porcentagem de imobilização em mais de 30%. Por outro lado, embora as microesferas com maior porcentagem de imobilização, apresentou recuperação da atividade, em torno de 70%. Quando a porcentagem de AM foi aumentada de 0 a 14,3% (Tipo 2), indicando um aumento na hidrofiliicidade, a recuperação da atividade, teve um aumento significativo de 17% (atingindo 87%, 418 g/L). Entretanto, com o aumento contínuo da porcentagem de AM - 14,3% para 28,6% (Tipo 3), a recuperação da atividade teve uma drástica diminuição, ou seja, apenas 53% mantiveram sua atividade.



**Figura 19** – Efeito hidrofóbico/hidrofílico da superfície de microesferas magnéticas na imobilização da lipase (Adaptado de Zhang *et al.*, 2012).

Zhang e seus colaboradores chegaram à conclusão que um suporte mais hidrofóbico proporciona um resultado melhor em relação a imobilização de enzimas, mas a recuperação da sua atividade não é muito elevada. Com isso, os suportes poliméricos para imobilização devem apresentar uma moderação na hidrofiliicidade/hidrofobicidade, alcançando assim valores satisfatórios para ambos os casos.

#### 2.4– BIOCATALISADORES COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

A quitosana é um polissacarídeo natural proveniente da desacetilação da quitina, que é encontrada na carapaça de insetos, camarões e outros crustáceos, de baixo custo, biocompatível e biodegradável. Ela é considerada o terceiro

polímero natural mais abundante na natureza (Torres *et al.*, 2005; Laranjeira *et al.*, 2009; Croisier & Jérôme, 2013). Com uma grande quantidade de grupos reativos presente na sua estrutura, faz com que este polímero, seja um suporte ideal para a imobilização de enzimas.

As pesquisas na formulação de microesferas de quitosana, como suporte polimérico, vem sendo um estudo paralelo as pesquisas com reatores fluidizados com estabilidade magnética, pois através da introdução de nanopartículas magnéticas a estes suportes, possibilita a aplicação em novos processos de transesterificação em reatores (Zong *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014; Román *et al.* 2017).

Dentre inúmeras nanopartículas estudadas ao longo desses anos, a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), tem demonstrado grande atrativo na incorporação de microesferas de quitosana, pois o seu comportamento de superparamagnetismo e sua alta biocompatibilidade, proporciona sua utilização em reatores de leito fluidizados assistidos por campo eletromagnético externo (Liu *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2014; Román *et al.* 2017).

Entretanto, como visto em vários trabalhos citados na literatura, o principal objetivo em incorporar nanopartículas de magnetita em microesferas de quitosana para a imobilização de enzima, ainda é para facilitar a separação dos biocatalisadores do meio reacional, proporcionando então, sua reutilização.

Mas, a especificidade das nanopartículas magnéticas são influentes aos processos que utilizam reatores fluidizados estabilizados por campos magnéticos, pois através da sua influência, é possível estimar condições ótimas de operação, inferências magnéticas e o fluxo. Uma outra característica citada, é a capacidade do material em não reter parte do campo magnético após a interrupção do mesmo (Zhou *et al.*, 2014; Román *et al.* 2017).

Pan *et al.* (2009) estudaram a imobilização da enzima  $\beta$  – D galactosidase em nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) revestidas com quitosana, previamente ativadas com glutaraldeído (GLU). Em seus resultados puderam otimizar o processo de catálise obtendo um pH ótimo de 6, operando em uma temperatura

ótima de 60°C. O rendimento de conversão do processo de transesterificação atingiu 62% da atividade, mantendo sua atividade residual por mais 15 ciclos.

Seguindo o mesmo estilo de suporte Wu *et al.* (2009) utilizaram nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) revestidas com quitosana, para a imobilização da lipase *Candida rugosa*. A magnetização saturada de nanopartículas atingiu 35,54 emu/g, mostrando as características de superparamagnetismo. Através do método do azeite de oliva perceberam que após 5 ciclos a atividade da enzima caiu apenas 12%.

Liu *et al.* (2011) estudaram as propriedades de magnetização para dois métodos distintos, na formulação de nanopartículas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) revestidas com quitosana. Em ambos os métodos as nanopartículas foram ativadas com GLU. A imobilização da lipase no suporte de nanopartículas preparadas com um campo magnético externo apresentou maior atividade, uma melhor estabilidade operacional e de armazenamento. Além disso os valores para as propriedades de magnetização foram superiores obtendo valores de Magnetização de saturação ( $M_s$ ) 13,7 emu/g; Magnetização residual ( $M_R$ ) 0,0061 emu/g e Coercitividade (C) 6,87 Oe.

Zhou *et al.* (2014) imobilizaram a lipase *Rizopus oryzae* em microesferas de quitosana com núcleo magnético, afim de utilizar este biocatalisador no processo de transesterificação do óleo de soja. Através da análise de susceptibilidade magnética, poderão obter um valor de magnetização de saturação de 38,1 emu/g nas microesferas com lipase imobilizada, valor este se encontra dentro da faixa de um material superparamagnético. Possibilitando a utilização do biocatalisador em um reator de leito fluidizado com campo magnético externo.

## CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

### 3.1 – MATERIAIS

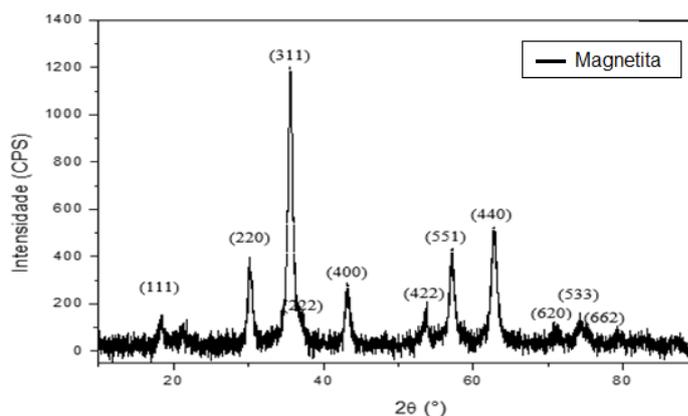
- Quitosana (Sigma-Aldrich), com grau de desacetilação de 80% e massa molar média;
- Cloreto de Ferro III (ICO) Hexahidratado (Vetec Química Fina Ltda); Grau de Pureza: P.A.;
- Sulfato de Ferro II (OSO) Heptahidratado (Vetec Química Fina Ltda); Grau de Pureza: P.A.;
- Ácido Acético e Ácido Clorídrico (Vetec Química Fina Ltda); Grau de Pureza: P.A.;
- Ácido Oleico (Synth); Grau de Pureza: P.A.;
- Hidróxido de Sódio (NaOH) (Neon), Grau de Pureza: P.A.;
- Hidróxido de Amônia (Vetec Química Fina Ltda); Grau de Pureza: P.A. Concentração: 30% NH<sub>3</sub>;
- Álcool Etílico (Jalles); Grau de Pureza: 99,5°INPM;
- Amano Lipase AK, from *Pseudomonas fluorescens*, fornecido pela Sigma-Aldrich;
- Albumina Bovina Fração V, fornecida pela Sigma Aldrich;
- Reagente Bradford, fornecido pela Bio-Rad;
- Glutaraldeído 50% solução, (Dinâmica), Grau de Pureza P.A.;
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) (Sigma-Aldrich), Grau de Pureza P.A.;
- Polietilenoglicol 1500, Vetec-Química Fina, P.A.;
- Fosfato de Sódio Bibásico Heptahidratado (Neon) P.A.;
- Fosfato de Sódio Monobásico Monohidratado (Neon) P.A.;
- Goma Arábica em pó, Teor de 85%, Vetec-Química Fina;
- Azeite de Oliva Extra Virgem (Gallo)

## 3.2 – MÉTODOS

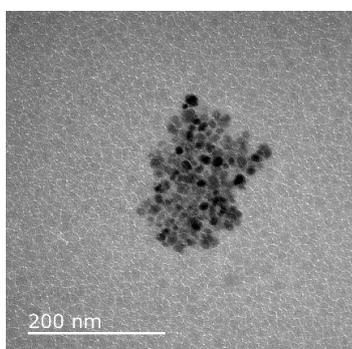
### 3.2.1 – NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - nanomagnetitas)

A partir das adaptações feita pelo método proposto por Gnanaprakash, 2007; a nanomagnetita utilizada foi formulada e relatadas como parte das pesquisas realizadas em partículas com propriedades magnéticas pelo grupo de pesquisa “Polímeros a partir de recursos renováveis”, do qual o autor desse trabalho faz parte. (Bôa Morte, 2017).

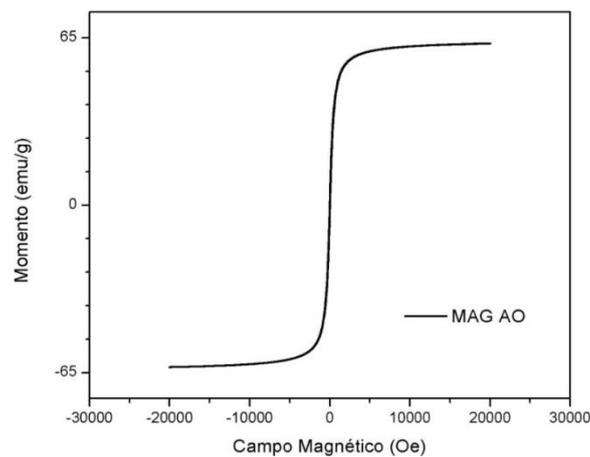
A fase magnética foi caracterizada por Difração de Raios-X (Figura 20), Microscopia Eletrônica de Transmissão (Figura 21) e Susceptibilidade Magnética (Figura 22). Tais resultados comprovam que o material sintetizado de fato se trata de nanomagétita, apresentou tamanhos adequados para o uso pretendido, boa dispersão e magnetização de saturação característica de um material superparamagnético.



**Figura 20** – Difratograma de Raios-X da magnetita sintetizada (Bôa Morte, 2017).



**Figura 21** – Micrografia eletrônica de transmissão das nanomagnetitas (Bôa Morte, 2017).



**Figura 22-** Curva de magnetização de saturação da nanomagnetita (Bôa Morte, 2017)

### 3.2.2 – FORMULAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA

O método adotado para a formulação das microesferas baseia-se na neutralização de uma solução ácida de quitosana através de uma base forte, sendo o hidróxido de sódio (NaOH) o mais utilizado. Este método é conhecido como coagulação (Dias *et al.*, 2008).



**Figura 23** – Esquema formulado para a técnica de coagulação.

As microesferas foram preparadas a partir da solução de quitosana - 2g do polímero em pó, solubilizado em 100mL de uma solução de ácido acético 5% (m/v). Após a solubilização, a solução foi filtrada para a remoção de resíduos, que logo em seguida foi gotejada através de uma agulha sobre uma solução de hidróxido de sódio (NaOH – 3mol/L) com o auxílio de uma bomba peristáltica (Figura 23).

### 3.2.3 – ATIVAÇÃO DOS GRUPOS HIDROXILA DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA

A modificação superficial das microesferas foi elaborada a partir de dois métodos distintos. O primeiro utilizou uma adaptação proposta por Chiou *et al.* (2004), para cada grama de microesferas de quitosana seca (QTS-AM1) e molhada (QTS-AM2), foi adicionado 3mL de 0,75% (m/v) de solução de 1-etil-3-(3-dimetil-aminopropil) carbodiimida (EDC) em 0,05 mol/L de solução tampão fosfato (pH 6,0) a 25°C. Após o tempo de 15 min, as microesferas foram lavadas com água destilada.

A outra modificação, foi elaborada a partir de alterações realizadas no método proposto por Oliveira & Vieira (2006) (QTS-AM3), para cada grama de microesferas de quitosana seca, utilizou 30mL de solução de carbodiimida  $3,7 \times 10^{-4}$  mol/L, preparada em solução tampão 0,1 mol/L, (pH 7,0) a 25°C, após 30 min de reação, as mesmas foram lavadas para remoção do excesso de EDC.

### 3.2.4 – CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS DE QUITOSANA

As microesferas modificadas (QTS-AM1, QTS-AM2, QTS-AM3) foram caracterizadas com o auxílio das técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIV), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Análise Termogravimétrica (TGA). Já as microesferas sem magnetita, foram analisadas através da técnica de Ressonância Magnética Nuclear de baixo campo (uma vez que o óxido de ferro sintetizado neste trabalho, interfere nos sinais obtidos por esta técnica) e Difração de Raio-X (DRX).

### 3.2.4.1– ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO COM TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIV)

A absorção de radiação pelas moléculas na região do infravermelho causa transições rotacionais e vibracionais de 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, grupos funcionais entre outras características estruturais particulares do polímero (Carvalho, 2008).

A análise no FTIV foi realizada com o objetivo de examinar a característica tanto das estruturas químicas dos filmes quanto das formulações das microesferas (QTS-AM1, QTS-AM2, QTS-AM3) para acompanhar a presença dos grupos (-OH e -NH<sub>2</sub>), agrupamentos objetos de modificação.

Os espectros do FTIV foram analisados na região de 4000 a 400 cm<sup>-1</sup>, com 40 varreduras em um equipamento de Infravermelho com Transformada de Fourier (IRPrestige-21/ Shimatzu) que se encontra no prédio do Laboratório de Materiais Avançados no Setor de Polímeros (LAMAV/SEPOL). Os espectros de FTIV das microesferas foram obtidos usando pastilhas de brometo de potássio (KBr).

Em relação aos filmes, foi acoplado a este equipamento um acessório com reflexão total atenuada (ATR), operando em um ângulo de incidência de 45°. O intuito desta análise foi acompanhar a modificação superficial feita no polímero, afim de investigar os agrupamentos característicos da modificação com EDC.

Os espectros foram então, obtidos a partir do intervalo de 4000-400cm<sup>-1</sup>, com resolução de 1,0cm<sup>-1</sup> com um total de 40 scans.

### 3.2.4.2 – RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) DE BAIXO CAMPO

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear é uma técnica amplamente usada para o estudo da estrutura molecular dos compostos. Baseia-se na alteração do número quântico de spin em função de um campo magnético externo. A excitação do núcleo, ou a sua oscilação de uma orientação para outra,

é detectada como uma voltagem induzida, resultando da absorção de energia do campo de radiofrequência (Santos *et.al*; 2015).

A ressonância magnética nuclear (RMN) de Baixo Campo é um método poderoso para obter informação sobre a mobilidade molecular utilizando medições de relaxação obtidas a partir do tempo de relaxamento da análise do próton de spin-rede ( $T_1H$ ). Esta técnica é usada para avaliar a miscibilidade, homogeneidade e compatibilidade de mistura de polímero ao nível molecular. É bem conhecido que as propriedades do polímero são dependentes tanto da estrutura molecular (por ordem molecular e dinâmica molecular) e a organização das cadeias no estado sólido. O parâmetro  $T_1$  é o tempo que o núcleo de hidrogênio presentes na amostra leva para relaxar, ou seja, voltar ao seu estado fundamental após a excitação e a sequência de pulsos tradicionalmente empregada é a inversão de recuperação ( $180^\circ - \tau - 90^\circ$ ) (Santos *et.al*; 2015).

A relaxação spin-rede é muito sensível, não só para as rotações/reorientações moleculares locais, mas também a auto translacional de difusão das moléculas, porque o  $^1H$  da relaxação spin-estrutura depende das interações dipolares que podem ocorrer entre rotações Inter ou intramoleculares (Santos *et.al*; 2015).

A utilização da análise de ressonância magnética nuclear de baixo campo teve como objetivo analisar a mobilidade molecular por meio dos domínios de tempo de relaxação da cadeia polimérica da quitosana *in Natura* e das microesferas modificadas, considerando as medidas de relaxação dos prótons de spin-rede ( $T_1H$ ). Para tanto, as análises de RMN de baixo campo foram feitas no equipamento Maran Ultra (Oxford Instruments), operando num campo magnético de 23,0MHz localizado no Instituto de Macromoléculas Professora Eloisa Mano da Universidade Federal do Rio de Janeiro – IMA/UFRJ.

A medida da relaxação longitudinal (Inversão – recuperação) foi feita empregando a sequência de pulso:  $180^\circ - \tau - 90^\circ$ , operando num intervalo de tau:0,1 a 5000 milissegundos, tendo 1 segundo de tempo de espera entre cada medida de tau. As medidas foram realizadas a 28°C. Com 40 pontos e 4 scans por ponto.

#### 3.2.4.3 – ESTUDO DO COMPORTAMENTO TÉRMICO DAS MICROESFERAS POR TERMOGRAVIMETRIA (TGA)

A análise termogravimétrica foi realizada com auxílio do sistema TGA Q 5000 (TA Instruments) – presente no Setor de Polímeros do Laboratório de Materiais Avançados/ UENF – com sensibilidade na termobalança de 0,1µg. As amostras secas foram analisadas na faixa de temperatura de 25-900°C com uma taxa de aquecimento de 10°C/min e uma atmosfera dinâmica (50 mL/min) de nitrogênio. Esta análise teve como objetivo a determinação da mudança da estabilidade térmica dos suportes modificados com os agentes bifuncionais e a capacidade de adsorção de água.

#### 3.2.4.4 – ESPECTROMETRIA DE MASSA (MS)

O registro do espectro de massa por impacto eletrônico é resultante do bombardeamento de elétrons nas moléculas do material a ser analisado; quando esse se encontra em fase gasosa. O objetivo desta análise foi identificar os produtos de degradação voláteis eluidos através de um capilar de quartzo diretamente do sistema termogravimétrico durante o processo de degradação térmica da quitosana *In Natura* (QTS) assim como das microesferas modificadas com EDC a través dos fragmentos destes formados na câmara do espectrômetro de massas.

A fragmentação dos produtos de degradação térmica e obtenção dos espectros de massas destes foi realizado num espectrômetro de massa quadrupolar Balzers ThermoStar, operando em uma faixa de massa de 1 a 200 u.m.a. (LAMAV/SEPOL).

#### 3.2.4.5 – MORFOLOGIA SUPERFICIAL DOS SUPORTES DE QTS E QTS-MODIFICADA

As micrografias de varredura foram obtidas num Microscópio Eletrônico de Varredura (Modelo – Evo40 da ZEISS), operando com tensão de aceleração

de 10 keV, disponível no Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (LBCT) do CBB/UENF com a colaboração do Professor Flávio C. Miguens. As microesferas foram depositadas em porta-amostra com fita adesiva de grafite e metalizadas.

O objetivo da análise é determinar a morfologia das microesferas de quitosana *in Natura* (QTS) e das microesferas modificadas (QTS-AM1, QTS-AM2, QTS-AM3), analisando o seu tamanho e a sua superfície.

#### 3.2.4.6 – DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DAS MICROESFERAS

O objetivo de aplicar a técnica de granulometria em partículas sólidas, basicamente é determinar uma estimativa do seu tamanho, ou de uma frequência com que ocorre em uma determinada classe ou taxa de tamanho.

Assim sendo, a distribuição de tamanho das microesferas de quitosana *in Natura* (QTS) e das modificadas com EDC (QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3), foi estabelecido através de micrografias confocais feitas por um microscópio confocal Olympus Lext modelo 3D Measuring Laser Microscope OLS4000, localizado no Laboratório de Materiais Avançados na unidade de Materiais Superduros. O cálculo do tamanho médio foi feito a partir de 4 micrografias (cada uma contendo aproximadamente 20-30 microesferas), onde foi avaliado tanto o tamanho como a distribuição do tamanho.

#### 3.2.4.7 – GRAU DE CRISTALINIDADE

Foram determinadas as percentagens de cristalinidade das microesferas de QTS *in Natura* e modificadas (QTS-AM1; QTS-AM2; QTS-AM3) utilizando um difratômetro Rigaku modelo: Ultima IV, instalado no Laboratório de Ciências Físicas – UENF, com radiação de  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda$  1,541 Å). Os difratogramas foram registrados entre ( $2\theta$ ) 5°-60° a uma taxa de 1°/min utilizando radiação de  $\text{Cu K}\alpha_1$  e uma tensão de 40 kV e corrente no filamento de 40 mA.

A percentagem e cristalinidade foi determinada com a equação 1 a partir das áreas de ajuste das curvas de deconvolução relativas as contribuições

cristalinas ( $A_{CR}$ ) e amorfa ( $A_{AM}$ ) utilizando para ajuste funções Gaussianas e Lorentzianas com auxílio do programa de ajuste Fityk 1.3.1.

$$XC (\%) = \frac{\sum A_{CR}}{\sum A_{CR} + A_{AM}} \times 100 \quad Eq. 1$$

Onde:

- $\sum A_{CR}$  é o somatório correspondente da região cristalina;
- $\sum A_{CR} + A_{AM}$  é o somatório correspondente da região amorfa;
- $XC (\%)$  percentual de cristalinidade.

### 3.2.4.8 – DETERMINAÇÃO DOS GRUPOS AMINOS DA QUITOSANA

Como foi mencionado na revisão bibliográfica deste trabalho, a quitosana é proveniente do processo de desacetilação da quitina. É através deste processo que se determina a classificação do mesmo, onde pelo percentual de grupos aminos é possível determinar o grau de desacetilação (GD).

Diferentes métodos e cálculos são descritos na literatura, para a determinação do grau de desacetilação da quitosana, ou até mesmo o grau de acetilação (GA). Neste contexto o presente trabalho utilizou a técnica de FTIV para estabelecer a relação das bandas referentes aos picos de absorção dos grupos funcionais da quitosana *in Natura* e das microesferas modificadas (QTS-AM1, QTS-AM2, QTS-AM3). Os espectros de absorbância foram obtidos pelo equipamento FTIV (IRPrestige-21/ Shimatzu), analisados na faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , 40 scans

A partir da equação estabelecida por Brugneroto et al. 2001 (Eq 2), foi possível analisar os espectros obtidos e a porcentagem tanto do GA quanto do GD.

$$GA(\%) = \frac{(A_{1320}/A_{1420}) - 0,3822}{0,03133} \quad Eq. 2$$

Onde:

- $A_{1320}$  é a absorvância referente a banda de  $1320\text{ cm}^{-1}$ ;
- $A_{1420}$  é a absorvância referente a banda de  $1420\text{ cm}^{-1}$ ;
- $100/1,33$  é o valor da proporção para uma quitosana acetilada.

### 3.2.5 – FORMULAÇÃO DOS SUPORTES COM PROPRIEDADES MAGNÉTICAS

Os suportes foram preparados a partir da solução de quitosana – 2g do polímero em pó, solubilizado em 100mL de uma solução de ácido acético 5% (m/v). Após a solubilização, a solução foi filtrada para a remoção de resíduos, que logo em seguida foi separada uma alíquota para a dispersão estequiométrica das nanomagnetitas sintetizadas, conforme a metodologia do item 3.2.3.

Após a completa homogeneização do sistema, a solução de quitosana/magnetita, foi gotejada através de uma agulha sobre uma solução de hidróxido de sódio (NaOH – 3mol/L) com o auxílio de uma bomba peristáltica. Logo após a formação dos suportes, os mesmos foram mantidos imersos por 24h, onde posteriormente seguiram para o processo de lavagem com água destilada, afim de eliminar o excesso de NaOH.

A partir daí os suportes passaram pelo processo de modificação com EDC, onde, o processo mais eficiente, foi estabelecido através da caracterização das microesferas de quitosana.

Após a modificação com o EDC, os suportes foram ativados com o glutaraldeído, onde o mesmo irá reagir com os grupos  $\text{-NH}_2$  da quitosana formando um braço espaçador.

Os suportes foram embebidos em solução de glutaraldeído 8% (v/v) em solução tampão fosfato de sódio 0,1mol em pH 7, onde o sistema foi mantido sob agitação de 6 horas com temperatura de  $30^\circ\text{C}$ , com velocidade de 160rpm. Após esse período, os suportes foram lavados 3 vezes com solução tampão fosfato pH7 e água destilada (Carvalho, 2012; Marum, 2013), onde, em seguida,

foram submetidos ao processo de imobilização, como descrito no item 3.9 deste trabalho.

### 3.2.6 – IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE POR LIGAÇÃO COVALENTE NO SUPORTE DE QUITOSANA

Após o período de ativação com glutaraldeído e a carbodiimida, o suporte foi submetido ao processo de imobilizado por ligação covalente de acordo com a metodologia adaptada de Carvalho, 2012 e Mendes *et al.*, 2013.

Para cada grama de suporte ativado (matéria úmida), foram adicionados 0,5mg de lipase na forma livre. PEG-1500 adicionado com a solução de enzima (85mL de tampão fosfato de sódio pH7) em um valor de 5mg/mL de suporte, para a fixação da lipase ao suporte efetuou-se em agitação durante 4h em temperatura de 25°C, e seguido por período adicional de 16h 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, as massas enzimáticas e das amostras lavadas foram mensuradas segundo a metodologia descrita para determinação da atividade enzimática, com o objetivo de se conhecer a concentração da lipase *Pseudomonas fluorescens* AK e das imobilizadas nas esferas de quitosana e das esferas de quitosana modificadas.

### 3.2.7 – QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE PROTEÍNA DA SOLUÇÃO ENZIMÁTICA

O método de Bradford, foi utilizado para a quantificação de proteína, tendo a Albumina de soro bovino (BSA) como padrão. O processo de reação baseia-se na conversão do corante Coomasse Brilliant Blue BG-250 numa forma azul intensa, essa coloração se dá pela presença dos grupos  $-NH_3^+$  das proteínas interagindo com o ânion presente no corante (Bradford, 1976; Carvalho, 2012).

Para a leitura da quantificação de proteína, a lipase foi solubilizada em solução tampão (5 mg/mL) pelo período de 30 min e adicionado 10  $\mu$ L de amostras em uma placa de Elisa, com diluições de 1,2x; 1,6x; 2x e 4x. A análise

foi feita em um espectrofotômetro Plate Chameleon V, modelo 425-106 Multilabel Conter (CBB/UENF) operando em uma banda de absorvância de 595 nm. A quantidade de proteína foi então estimada através das leituras de absorvância referentes à curva padrão de BSA, que foi utilizado para determinar a quantidade de proteína em amostras desconhecidas (Bôa Morte, 2017).

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:

$$Q_i = C_{s1} - C_{s2} \quad \text{Eq. 3}$$

Com  $Q_i$  quantidade de enzima imobilizada,  $C_{s1}$  igual a concentração da enzima livre e  $C_{s2}$  a concentração de enzima após a imobilização na solução de partida.

### 3.2.7.1 – TEOR DE ENZIMA IMOBILIZADA

Outra informação retirada da leitura de Bradford foi o rendimento de imobilização ( $\eta$ ), que foi calculado pela equação 6, que consiste na quantificação do teor de proteína presente na solução inicial, antes da adição dos suportes de imobilização ( $P_0$ ) e a quantidade de proteína residual presente no sobrenadante após a imobilização ( $P_1$ ) (Simões, 2011).

$$\eta = \frac{P_0 - P_1}{P_0} \times 100 \quad \text{Eq. 4}$$

### 3.2.8 – DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE HIDROLÍTICA

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 Soares et al 1999 e Carvalho, 2012. Uma unidade de atividade foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar  $1\mu\text{mol}$  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 min. 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 min.

Após esse período de incubação, a reação então foi paralisada pela adição de 10mL 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 min 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, adicionadas em uma solução de NaOH 0,1mol/L. O volume gasto foi anotado para a realização dos cálculos da equação a seguir: (Carvalho, 2012; Aguiar et al., 2010 e Barbosa et al., 2014).

$$A(U/g) = \frac{(V_a - V_b) \times M \times 10^3}{t \times m} \quad \text{Eq. 5}$$

Onde:

- M = concentração molar da solução de NaOH;
- m = massa da enzima;
- t = tempo de reação em minutos;
- V<sub>a</sub> = volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL);
- V<sub>b</sub> = volume de NaOH gasto na titulação do controle (mL).

### 3.2.9 – ESTUDO DO EFEITO DO pH E DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE ENZIMÁTICA

### 3.2.9.1 – IMPACTO DO pH SOBRE ATIVIDADE ENZIMÁTICA

Para a determinação da melhor condição da atividade enzimática durante o processo de hidrólise da emulsão do azeite de oliva, para a enzima imobilizada nos suportes de quitosana, foi preparada soluções de tampão fosfato, variando o pH do meio. As variações foram operadas na faixa de valores de pH 6,5; 7,5 e 8,5 (Xie et al., 2010).

### 3.2.9.2 – EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE ATIVIDADE HIDROLÍTICA

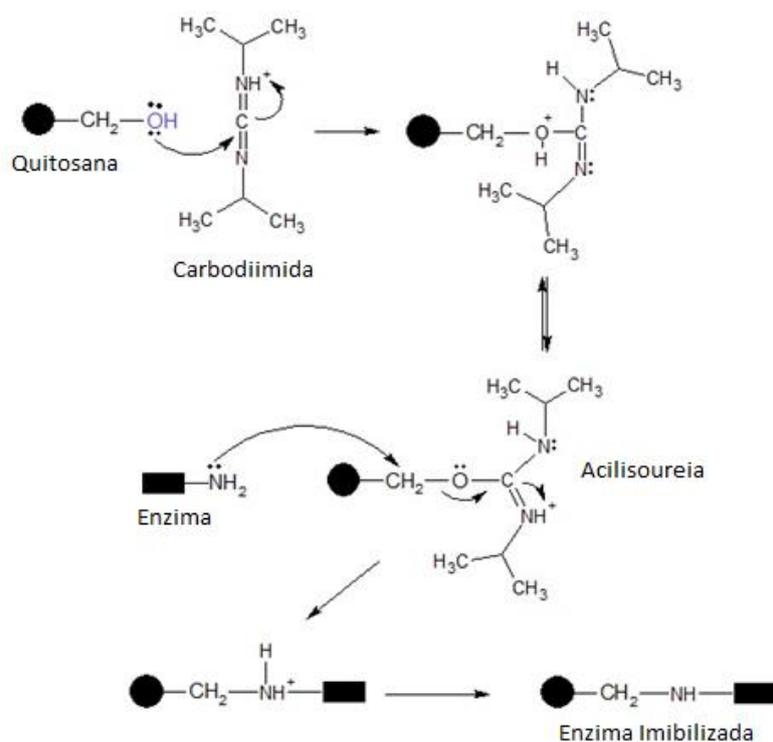
Segundo Dizge et al. (2008), as lipases são enzimas que trabalham em uma determinada faixa de temperatura que compreende entre 30-70°C. Baseando então, no trabalho reportado da literatura, de modo a investigar com mais detalhe o efeito da temperatura no processo de transesterificação enzimática, as condições de trabalho foram determinadas nas seguintes temperaturas: 30, 40, 50 e 60.

## CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1– MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA COM AGENTES BIFUNCIONAIS.

Na literatura se reporta a ativação dos grupos amino da quitosana para imobilização de enzimas, sendo considerada a ativação dos grupos hidroxila da quitosana uma alternativa que proporciona uma melhor estabilidade enzimática e ativação de ambos sítios ativos, “imobilização binária” (Hung et al., 2003).

O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC), é um agente bifuncional solúvel em água, utilizado na ativação da quitosana através do grupo funcional a hidroxila (-OH).



**Figura 24** – Mecanismo de ativação da QTS com Carbodiimida.

No mecanismo proposto para a reação (Figura 24), um grupo de OH da quitosana ataca nucleofílicamente a carbodiimida eletrofílica do EDC, há então a formação de um complexo intermediário instável, a acilissoureia, que posteriormente no processo de imobilização.

O complexo pode ser facilmente ligado aos grupos amino, mais frequentemente grupo  $\epsilon$ -NH<sub>2</sub> de um resíduo de lisina e grupos carboxílicos dos resíduos de ácido glutâmico e ácido aspártico das cadeias de proteína, fazendo expondo assim o centro ativo da enzima ao meio reacional. (Hung et al., 2003; Chiou et al., 2004; Long et al., 2015).

#### 4.2 – ESPECTROSCOPIA NO INFRAVERMELHO DAS MICROESFERAS MODIFICADAS (FTIV)

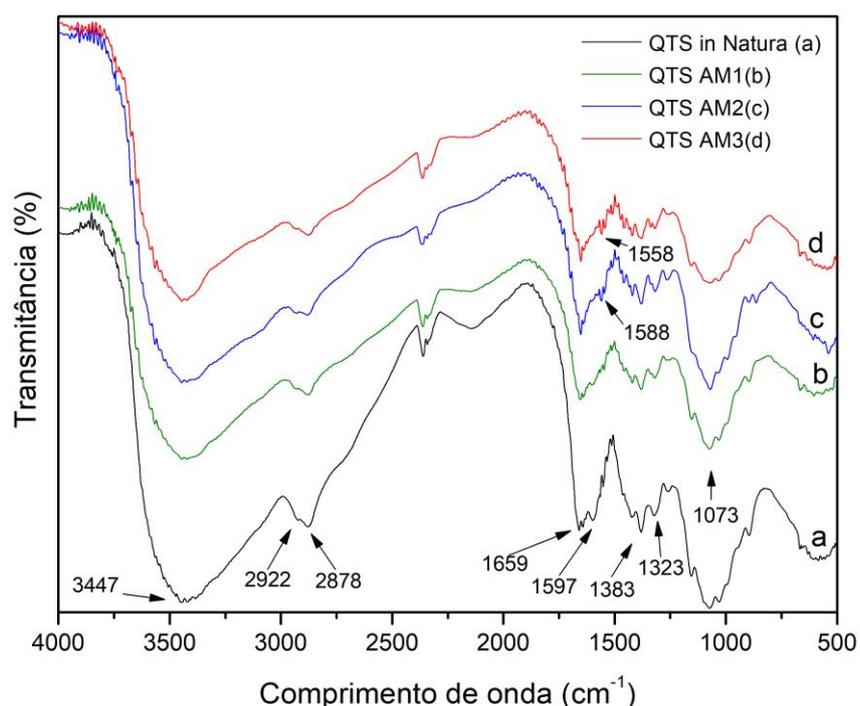
Afim de verificar possíveis alterações, ocasionadas pela ativação com EDC nas microesferas de quitosana, antes e após serem realizados os processos de modificações de acordo com seção 3.2.3, proposto neste trabalho. Os resultados obtidos pelos espectros gerados com a análise de FTIV, são observados na Figura 25.

De acordo com os resultados encontrados, os picos atribuídos ao espectro da quitosana *in Natura* (QTS), foram em 3447cm<sup>-1</sup> corresponde as vibrações de estiramento da ligação O–H, que sobrepõe as vibrações de alongamento da ligação N–H; 2922 cm<sup>-1</sup> e 2878 cm<sup>-1</sup>, respectivamente são relacionadas as vibrações simétrica do grupamento CH<sub>2</sub> (Silva et al. 2010; Souza et al. 2010; Kuo et al. 2012); em 1659 cm<sup>-1</sup> está relacionado a banda da amida I, que é originada através de vibrações de alongamento de C=O, a banda correspondente a amida II é observada em 1597 cm<sup>-1</sup>, devido as vibrações de deformação de N–H; 1323 cm<sup>-1</sup> corresponde a amina I, atribuída a vibração de C–N, onde ambos picos referidos, quando estão presente no espectro de FTIV da quitosana, indica que o polímero é um produto parcialmente desacetilado (Wang et al. 2003; Staroszczyk et al. 2014; Dong et al. 2014). Na banda de 1383 cm<sup>-1</sup> é referente ao grupo acetamido, devido à deformação da ligação C–H do grupo CH<sub>3</sub> (Coelho, 2006).

Como o de esperado, uma das características da quitosana é possuir bandas de absorção, 1154cm<sup>-1</sup> (alongamento não simétrico da ligação C–O –C),

e na região de  $1073\text{cm}^{-1}$  e  $1030\text{cm}^{-1}$ , ambas estão associadas as vibrações de alongamento da ligação C–O (Wang et al. 2003).

Na comparação dos espectros de QTS *in Natura* e QTS-AM1 (Figura 25), não houve mudanças significativas na estrutura do polímero, o que se observa é apenas uma ligeira diminuição nas intensidades dos picos, que através da relação de intensidade (Tabela 7) foi possível identificar essa característica. Essa ocorrência pode estar relacionada com a baixa concentração da solução modificadora, que por sua vez não foi suficiente para se ligar ao grupo funcional da quitosana.



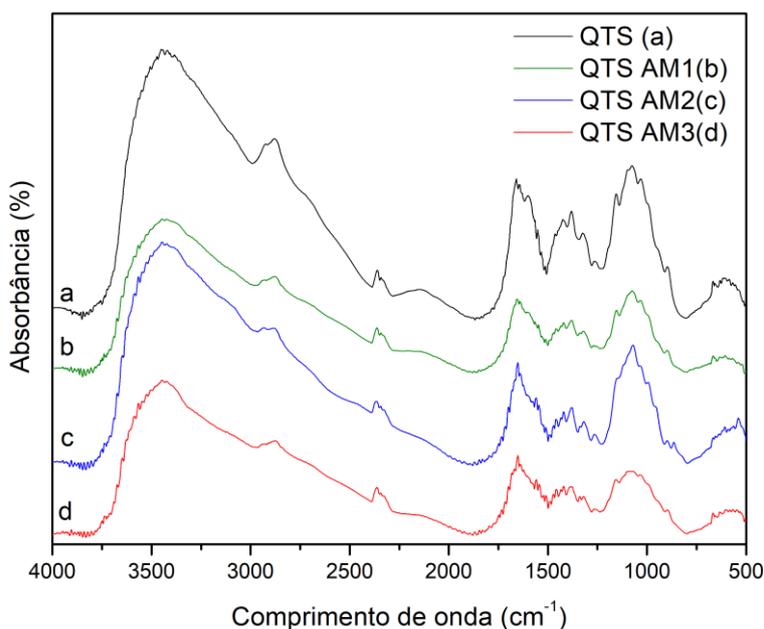
**Figura 25** – Espectros de transmittância no Infravermelho das esferas de quitosana *in Natura* e modificadas.

Em se tratando dos espectros da QTS-AM2 (Figura 25), é possível observar o aumento da relação da intensidade na banda  $1073\text{cm}^{-1}$  referente a vibração do grupo da hidroxila (-OH), em relação aos demais espectros, uma vez que, a modificação foi realizada na amostra ainda úmida, favorecendo a melhora na performance da modificação, havendo um pequeno estreitamento do pico, devido a preferência do EDC pelo grupo hidroxila.

Dong e seus colaboradores utilizaram nanoesferas magnéticas de quitosana para a remoção de ácido húmico de soluções aquosas, onde as mesmas foram modificadas com epícloridrina (agente bifuncional que liga a hidroxila), em seus resultados de FTIV, a banda  $1073\text{cm}^{-1}$  eventualmente, tornou-se mais estreita, provando o efeito de modificação entre grupos OH e a epícloridrina.

Outra característica observada com a análise de FTIV, foi o aparecimento de dois picos para as amostras QTS-AM2 e QTS-AM3. Tais picos, respectivamente, são das bandas de  $1588\text{cm}^{-1}$  e  $1558\text{cm}^{-1}$ , ambos são referentes as vibrações dos grupos amida N–H, provenientes da introdução de EDC na estrutura da quitosana (Chou et al., 2017).

Comparando as absorvâncias dos comprimentos de onda analisados (Figura 26), da QTS *in Natura* com as quitosanas modificadas (QTS-AM1; QTS AM2; QTS AM3), observou-se que as intensidades dos picos são bem sucintas, levando a crer que a modificação foi bem fraca. Assim, foi possível calcular a relação de intensidade (Tabela 7) dos grupamentos alvos da modificação que tiveram suas absorvâncias modificadas após o processo, em relação à absorvância do grupamento fixo na região de  $3447\text{cm}^{-1}$ .



**Figura 26** – Espectros de absorvância no Infravermelho das esferas de quitosana *in Natura* e modificadas.

**Tabela 7** – Relação de intensidade dos grupamentos, antes e após a modificação.

<b>Amostras</b>	$I_{OH / CONH_2}$ 1659cm <sup>-1</sup>	$I_{OH / C-N}$ 1558cm <sup>-1</sup>	$I_{OH / C-OH}$ 1076cm <sup>-1</sup>
QTS <i>in Natura</i>	2,0	2,2	1,7
QTS AM1	2,1	2,5	1,9
QTS AM2	2,2	3,4	1,9
QTS AM3	2,0	2,9	2,0

De acordo com a tabela, a relação de intensidade na região de 1659cm<sup>-1</sup> não houve mudanças com o processo de modificação com EDC, confirmando a ideia de que esse reagente bifuncional não possui afinidade com o grupamento amino da quitosana.

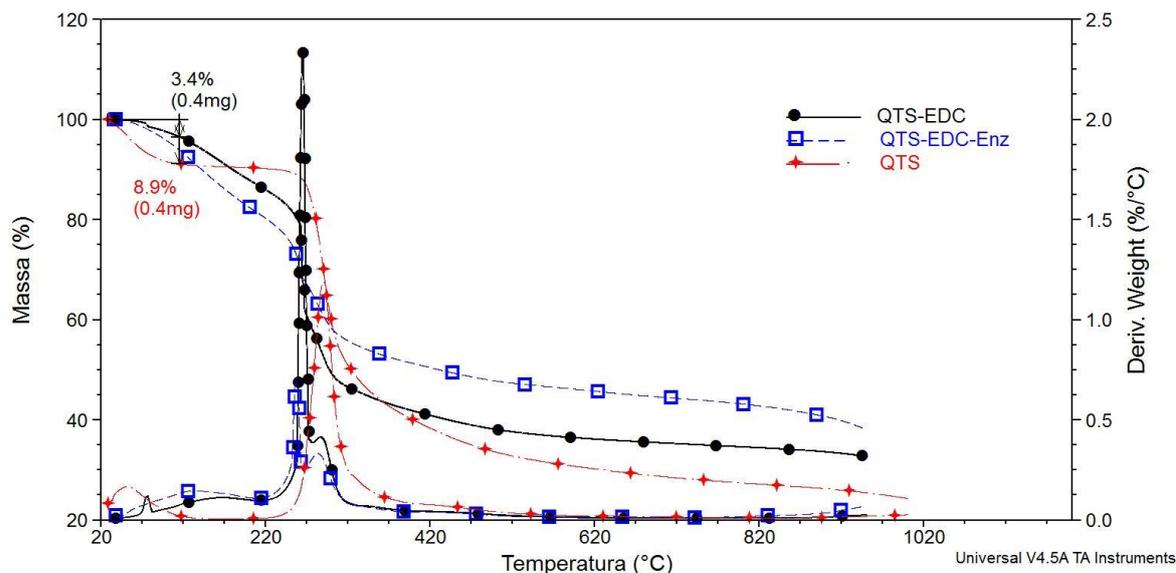
Por outro lado, observasse que a relação de intensidade na região de 1558cm<sup>-1</sup> houve um aumento significativo em comparação com a QTS *in Natura* e as quitosanas modificadas (QTS-AM1; QTS AM2; QTS AM3), este aumento possivelmente é devido a introdução do EDC como agente modificador, uma vez que o EDC possui grupamentos amida em sua estrutura (Chiou et al., 2004; Chou et al., 2017).

Com a análise de infravermelho permitiu confirmar que realmente ocorreu a modificação da QTS *in Natura* utilizando o EDC como agente ativador, pois através da identificação dos grupos alvos da modificação e da intensidade relativa, pode constatar que a modificação com EDC tem principal alvo os grupos hidroxila da quitosana, deixando livre os grupamentos amino, tornando assim, um ótimo ativador para suportes com a finalidade de imobilização de enzimas.

#### 4.3–ESTRUTURA E COMPORTAMENTO TÉRMICO DAS QTS MODIFICADAS COM EDC.

A estabilidade térmica dos suportes (Figura 27) está diretamente associada com a natureza das modificações realizadas. Se observa no intervalo de 40-100°C uma perda de massa associada a volatilização de água. A perda de massa relativa à presença de água na quitosana está associada aos grupos

amino (-NH<sub>2</sub>) ligados ao C-2, grupos hidroxila primários (-OH) ligados ao C-3 e grupos hidroxila secundários ligados ao C-6 que permitem estabelecer ligações de hidrogênio com a água, dando a este polissacarídeo uma característica hidrofílica (Sanchez-Silva et al., 2012, Liu et al., 2014; Qiao et al., 2015; Dantas et al. 2016). Já em câmbio a QTS ao ser modificada a través dos grupos hidroxila com o EDC tem uma redução de seu caráter hidrofílico como pode ser constatado na menor perda de massa (3,4%) associada a água.



**Figura 27** – Curvas termogravimétricas dos suportes de QTS *in Natura* e modificadas com EDC.

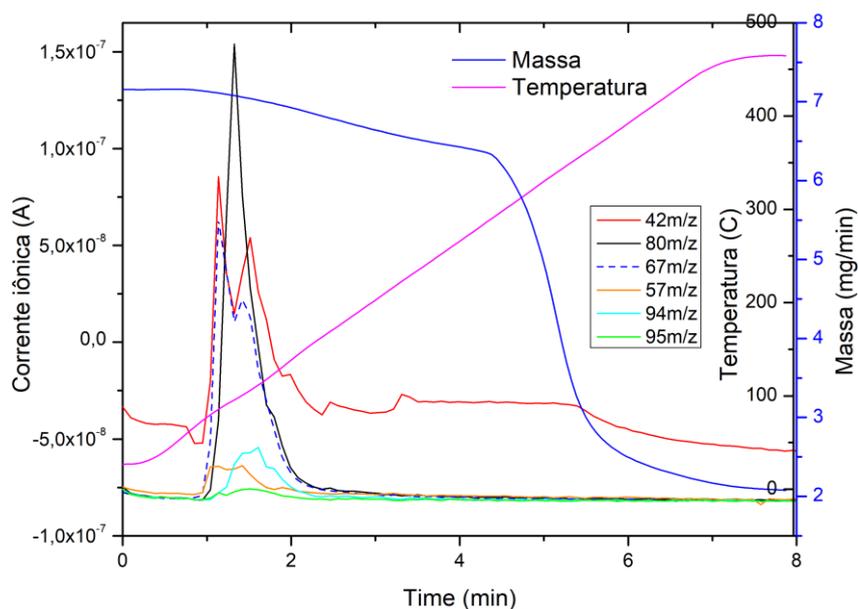
A degradação térmica associada a QTS apresenta uma temperatura com máxima taxa de degradação a 290°C, entretanto após modificação com EDC esta temperatura passa a ser de 260°C como consequência da modificação dos grupos hidroxilas que passam a formar grupos de acilisoureia de menor estabilidade térmica. A imobilização covalente da lipase neste suporte QTS-EDC não origina uma mudança marcada na estabilidade térmica.

As perdas acima de 260°C são atribuídas a processos complexos que envolve a desidratação dos anéis sacarídeos entre outros (Kumar et al., 2016; Almeida et al. 2018; Dantas et al., 2016; Dang et al., 2018).

Os biocatalisadores (QTS-EDC-Enz) apresentam uma temperatura “on set” de início da degradação acima da temperatura de uso potencial destes, determinada pela estabilidade das enzimas imobilizadas.

#### 4.3.1 – IMPACTO DA MODIFICAÇÃO DA QUITOSANA NA FORMAÇÃO DE FRAGMENTOS NO PROCESSO DE DEGRADAÇÃO TÉRMICA

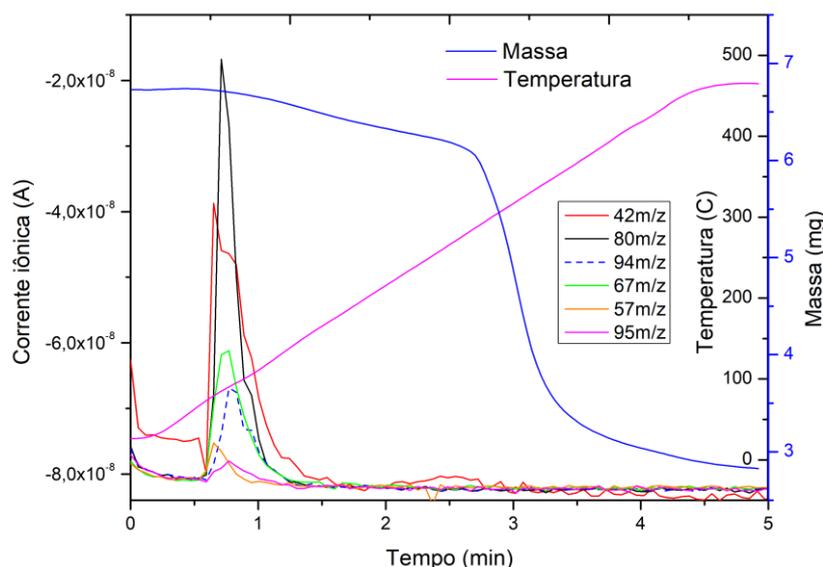
A análise da modificação da quitosana através das fragmentações que tem lugar no sistema TGA acoplado ao MS é um processo complexo. A formação de fragmentos acompanhados de possíveis rearranjos de alguns destes no processo de degradação térmica e a posterior fragmentação destes por impacto eletrônico na câmara do espectrômetro de massas dificulta a interpretação dos resultados e associação com as estruturas de origem. Entretanto é um método extremamente sensível e valioso que permite complementar a análise estrutural realizada com a espectroscopia de infravermelho (Carvalho, 2008; López et al. 2008; Garrido et al. 2007).



**Figura 28** – Espectro de massa e Termograma isotérmicos da quitosana *in Natura*.

Através do espectro de massa obtido para a quitosana *in Natura* (Figura 28) foi possível identificar as possíveis fragmentações, que no caso são essas: fragmento do grupamento  $C_2H_2O$  com massa  $m/z$  42; um pico menos intenso em

$m/z$  57  $[C_2H_4NO]^+$ , provenientes do grupo acetamida presente no monômero *N*-acetil-*D*-glucosamina, evidenciando que o polímero é parcialmente desacetilado. (López et al. 2008; Garrido et al. 2006).



**Figura 29** – Espectro de massa e Termograma isotérmicos da quitosana modificada com EDC.

Picos provenientes da fragmentação de massa de  $m/z$  67  $[C_5H_7]^+$  e  $m/z$  80  $[C_5H_6N]^+$  (Figura 29), são atribuídos a estrutura principal da quitosana, evidenciando que tais fragmentos podem ter sido originados pela fragmentação do monômero *D*-glucosamina (López et al. 2008; Garrido et al. 2006). As outras massas  $m/z$  94 ( $C_6H_6O/ C_5H_4NO$ ) e  $m/z$  95 ( $C_6H_7O/ C_5H_5NO$ ), tendo baixa intensidade, possivelmente são atribuídas as fragmentações complexas e modificação dos fragmentos formados a partir da cadeia principal do polímero.

Na quitosana modificada, através do seu espectro de massa (Figura 29), observa-se uma intensidade relativa mais baixa para os sinais  $m/z$  67 e  $m/z$  42, eventualmente devido a modificação sofrida pelo modificador EDC, uma vez que esse modificador se liga preferencialmente aos grupos hidroxila do polímero.

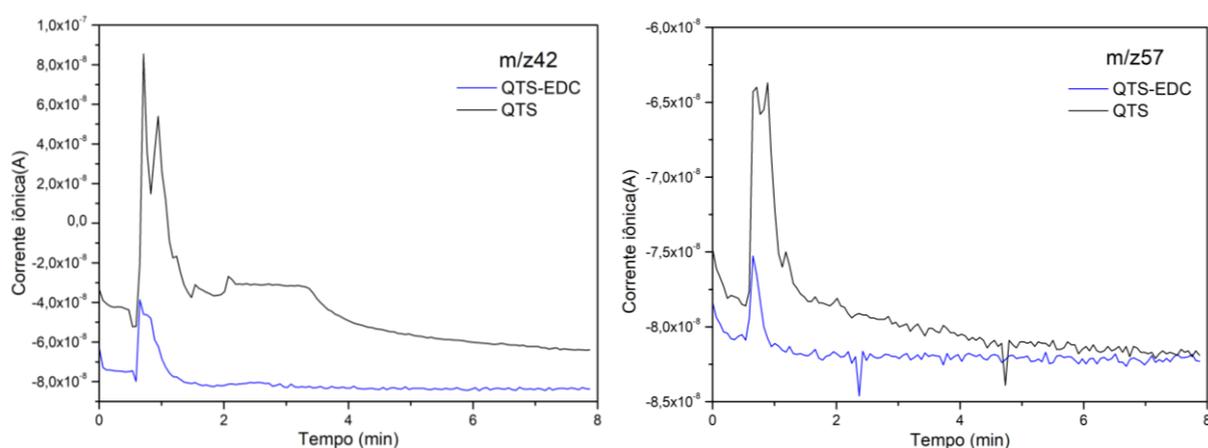
Outra mudança na intensidade é observada no sinal de  $m/z$  94 ( $C_5H_6N_2$ ), que neste caso corresponde a fragmentação formada na decomposição do modificador. Os outros fragmentos com massa ( $m/z$  80, 57 e 95), correspondem

aos fragmentos formados pela decomposição térmica da estrutura da cadeia principal da quitosana.

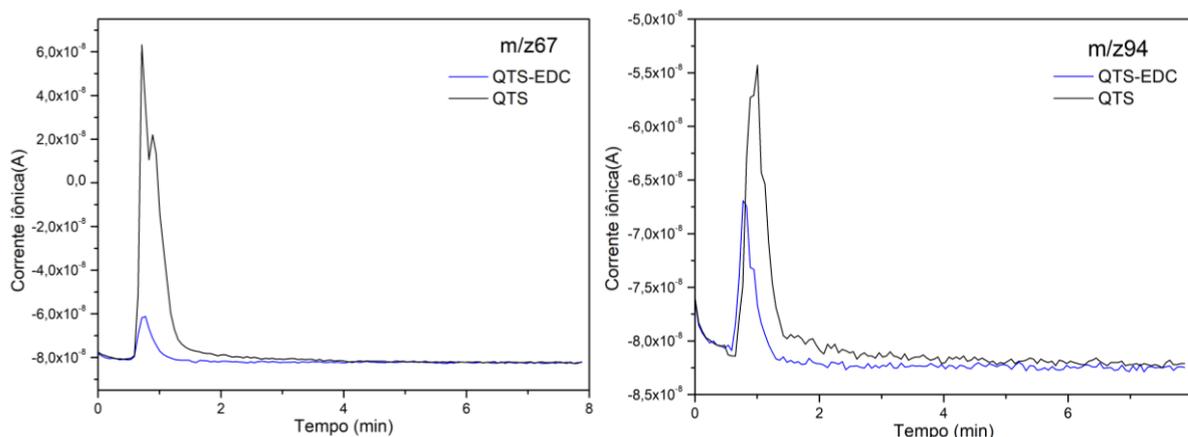
López *et al.* 2008; estuda o comportamento térmico da quitosana, através da termogravimetria e espectrometria de massa. Em seus resultados concluíram que a decomposição térmica da quitosana não adere um único mecanismo. Fragmentos de massa  $m/z$  67  $[C_5H_7]^-$  e  $m/z$  80  $[C_5H_6N]^+$  são relatados respectivamente para quitosana e o N-acetil-D-glucosamina, proveniente da quitina; massa  $m/z$ 60 referente ao ácido acético, produto característico da pirólise da quitina e a remoção de uma molécula de água do ácido acético pode produzir o fragmento de massa  $m/z$  42.

Zeng *et al.*, 2011, em seus estudos, descobriram que a quitosana começou a se decompor e produzir alguns compostos voláteis em torno de 525K (251,8°C), por meio da espectrometria de massa, foi possível identificar compostos voláteis de heterocíclicos aromáticos tais como: pirazinas, piridinas  $m/z$  93 (2-metilpiridina),  $m/z$  94 (metilpirazina),  $m/z$ 122 (trimetilpirazina),  $m/z$ 10 (2-etilpirazina), sendo provenientes da pirolise da cadeia principal da quitosana.

Observa-se como principal diferença da introdução do EDC na estrutura da quitosana a mudança das intensidades dos sinais de massa  $m/z$  42, 57, 67 e 94, (Figura 30 e 31).



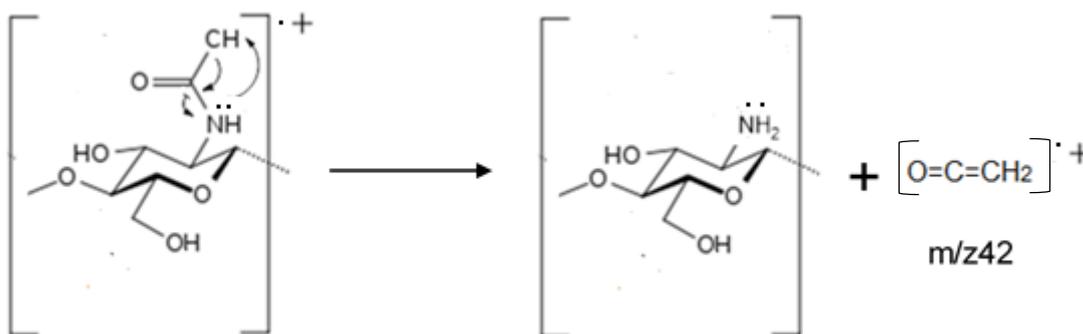
**Figura 30** – Espectro de massa dos fragmentos  $m/z$  42 e  $m/z$ 57 da quitosana *in Natura* e modificada com EDC.



**Figura 31** – Espectro de massa dos fragmentos  $m/z$  67 e  $m/z$  94 da quitosana *in Natura* e modificada com EDC.

Nas Figuras 30 e 31 se observam marcadas diferenças entre as intensidades relativas dos principais fragmentos detectados até  $m/z$  100 que junto aos resultados da análises por FTIV permitem considerar efetiva modificação da QTS com o EDC.

O fragmento  $C_2H_2O$  com relação massa carga 42 é característico da fragmentação da acetamida (Figura 32) presente na cadeia polimérica da quitosana *in Natura* parcialmente desacetilada.

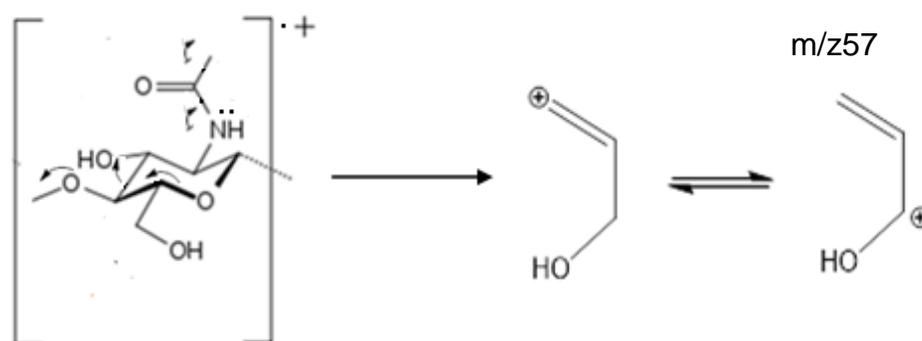


**Figura 32** – Mecanismo de fragmentação (MacLafferty) dos agrupamentos acetamida que podem originar o fragmento  $m/z$  42.

Após a modificação com o EDC a menor intensidade devida a contribuição a corrente iônica no espectrômetro de massas destes fragmentos, pode ser uma forte evidência do rearranjo que origina a presença da acilureia proveniente da

modificação dos grupos hidroxilas próximo na estrutura deste polissacarídeo modificado (Figura 24) o que originaria a formação do fragmento  $m/z$  42 a partir dos grupos acetil existentes na estrutura não modificada.

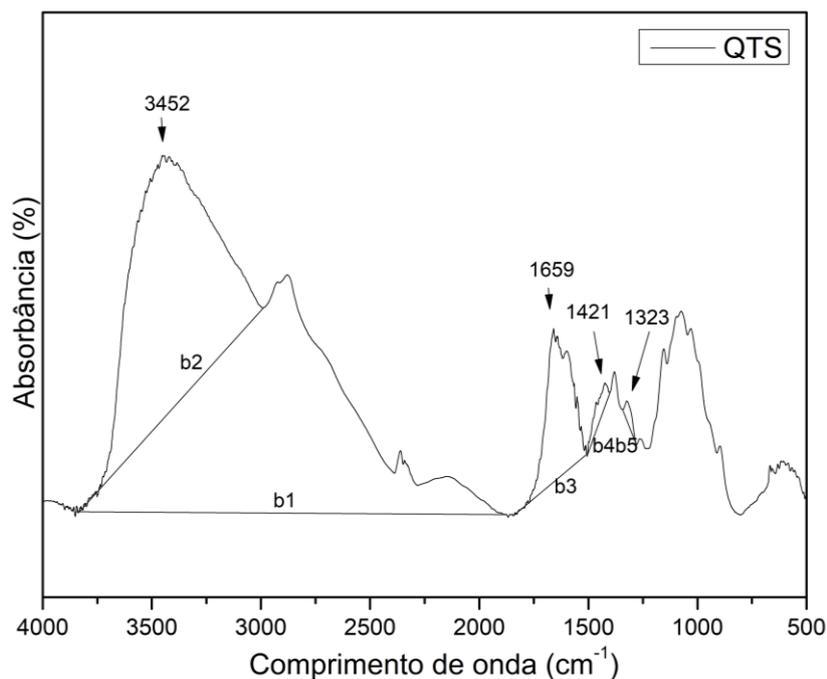
Um efeito similar proveniente da estrutura modificada com EDC pode ser responsável pela diminuição do fragmento com  $m/z$  57 (Figura 33) proveniente da QTS *in Natura*.



**Figura 33** – Mecanismo de fragmentação (MacLafferty) dos agrupamentos acetamida que podem originar o fragmento  $m/z$  57.

#### 4.4 – GRAU DE DESACETILAÇÃO DA QTS ANTES E DEPOIS DA MODIFICAÇÃO

O presente trabalho utilizou a espectroscopia de infravermelho (FTIV) para caracterizar o grau de desacetilação e a porcentagem dos grupos aminos das microesferas de QTS antes e após a modificação (QTS AM). A metodologia proposta por Brugneroto et al 2010, foi utilizada para de desacetilação (GD%) com auxílio da equação 2 (página 50), a relação das intensidades das bandas A1320 (absorbância a  $1320\text{ cm}^{-1}$  da banda amina I, atribuída vibrações de C–H) e A1420 (absorbância a  $1420\text{ cm}^{-1}$  vibração simétrica do grupamento CH<sub>2</sub>) das amostras objeto de estudo.



**Figura 34** – Espectro de absorvância da QTS *in Natura*.

A partir da absorvância do espectro de FTIV (Figura 34), o valor do grau de acetilação (GA%) da QTS *in Natura* foi de 16,7%, sendo o grau de desacetilação (GD%) de 83,3% (Tabela 8).

A percentagem (GD%) encontrada neste trabalho para a QTS objeto de estudo, fornecida pela Sigma-Aldrich está de acordo com a ficha técnica do produto (75-85%) obtido por desacetilação da quitina, provenientes de carapaças de camarões.

Santhosh e Mathew (2007), também reportaram valores semelhantes (GD 81%) para a quitosana obtida por desacetilação da quitina, produzida por fermentação de carapaças de camarão com o *Bacillus subtilis*.

As absorvâncias dos espectros para a QTS modificada com EDC (Figura 35), foram usadas para determinar a porcentagem do grau de desacetilação, tais valores estão representados na Tabela 8.

**Tabela 8** – Valores percentuais do grau de acetilação (GA) e desacetilação (GD), para a quitosana in natura e modificada (bandas A1320 / A1420).

<b>Amostras</b>	<b>GA (%)*</b>	<b>GD(%)</b>
QTS <i>in Natura</i>	16,7	83,3
QTS-AM1	17,6	82,4
QTS-AM2	16,9	83,1
QTS-AM3	15,5	84,5

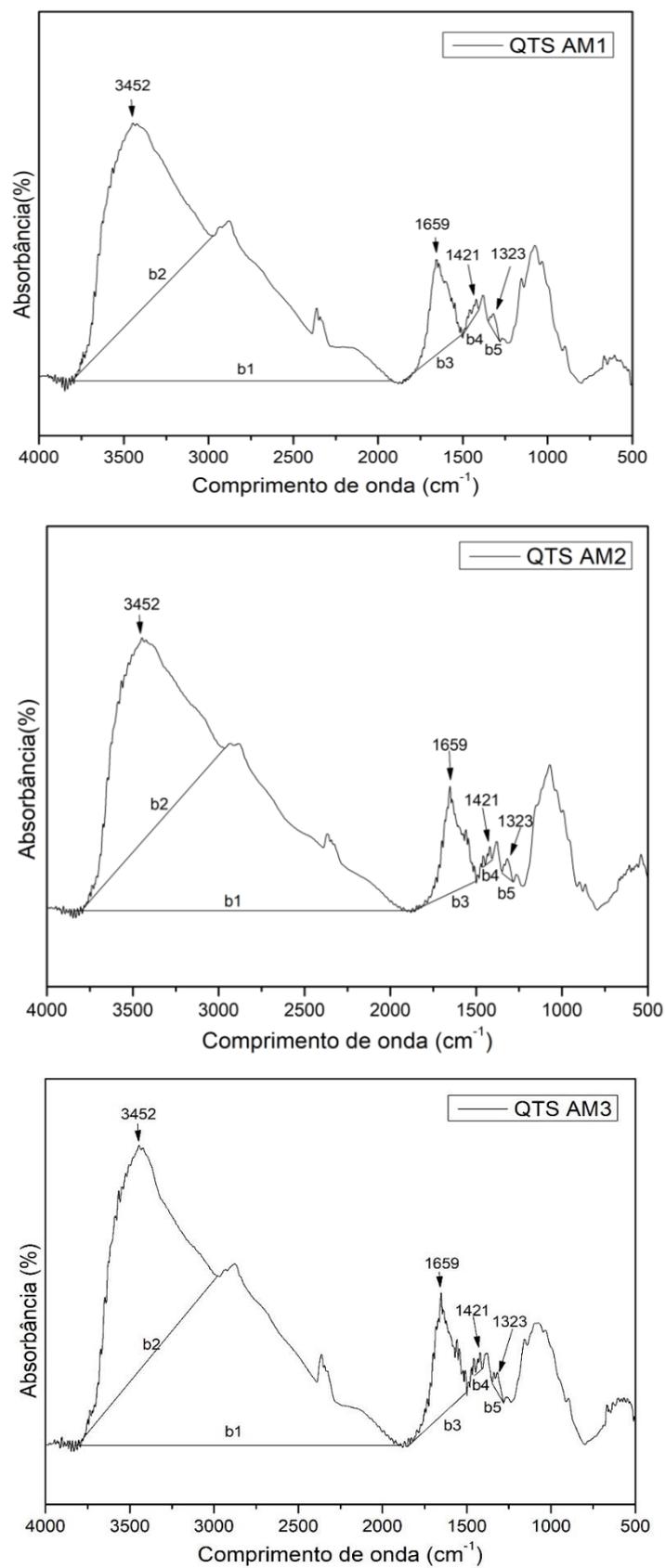
\*valores encontrados com a metodologia proposta por Brugneroto et al. 2001

Alvarenga et al 2011 sugerem a relação das intensidades das bandas A1655 (absorbância a  $1655\text{ cm}^{-1}$  da banda amida I) e A3450 (absorbância a  $3450\text{ cm}^{-1}$  da banda da hidroxila) a partir das quais o grau de acetilação (GA%) da QTS *in Natura* seria de 38,8% (GD% de 61,2%). Não entanto o uso destes sinais não resulta apropriado em nosso caso devido a que as intensidades dos sinais em torno de  $1655$  e  $1625\text{ cm}^{-1}$ , relativas as vibrações de alongamento dos grupos C-O e C-N (amida I), pode estar sobreposta afetando o valor da absorbância registrada no espectro.

Outra desvantagem é o uso da banda de  $3450\text{ cm}^{-1}$ , próxima a sinal dos grupos da hidroxila (-OH) presente no polissacarídeo e das moléculas de água que podem estar presentes na estrutura. Qualquer variação de umidade pode acarretar um aumento significativo do pico, promovendo interferência na análise (Kassai, 2008; Camacho et al. 2010).

A utilização da relação de absorbância das bandas A1320 / A1420, para determinar o grau de acetilação das quitosanas mostradas na Tabela 6 não estão afetadas pelo teor de água das amostras, ou seja, a umidade destas (Biskup et al 2012) aspecto relevante em nosso caso que foram empregadas metodologias de modificação diferentes.

Brugnerotto et al. 2001 analisaram que a determinação da relação das bandas A1320 / A1420 possui um erro experimental mais estreito que quando utilizada as relações A1655/A3450 independente do estado do material.

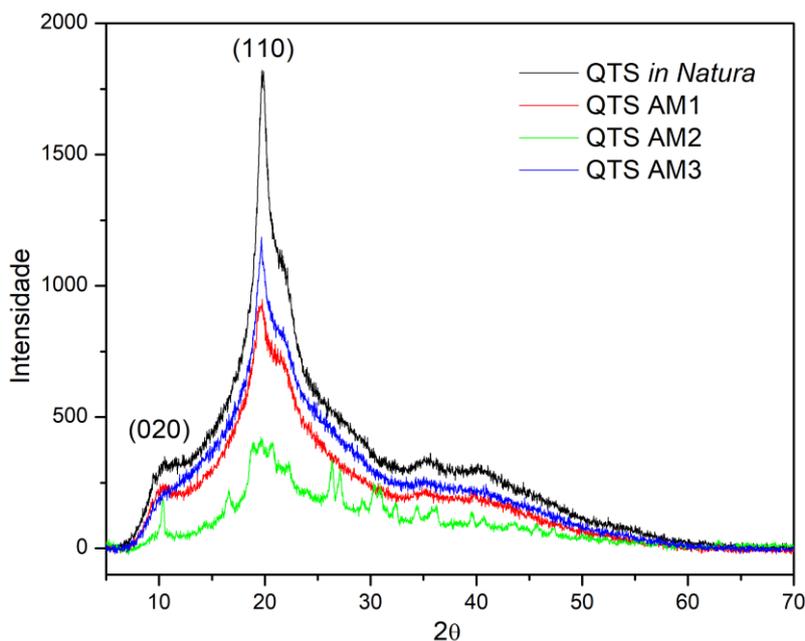


**Figura 35** – Espectro de absorbância da QTS modificada (QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3)

#### 4.5 – CRISTALINIDADE DAS MICROESFERAS DE QTS SEM MODIFICAR E MODIFICADAS

Com auxílio dos difratogramas (DRX) da quitosana *in Natura* e modificadas nas microesferas formuladas foi calculado a porcentagem de cristalinidade. O difratograma das microesferas com a quitosana (QTS) *in Natura* (Figura 36), apresentou um intenso pico na região de  $2\theta = 19,7^\circ$  e um ombro em torno de  $2\theta = 10,7^\circ$ , que corresponde com os planos cristalográficos (110) e (020) característicos da fase cristalina da QTS como relatado na JCPDS arquivo N°. 039-1894 (Olaru et al. 2018; Wu, et al 2017; Dantas et al. 2016; Vieira, et al 2014). Chagas e colaboradores (2013) assim como Abdel-Rahman e colaboradores (2015) reportaram a presença destes planos de difração e relações de intensidade semelhantes aos encontrados no presente trabalho.

A presença da fase cristalina na quitosana é propiciada pela presença de intensas interações secundárias intra e intermoleculares, provenientes das pontes de hidrogênios geradas através dos grupos funcionais (aminos e hidroxilas), as que contribuem na organização da cadeia polimérica (Lima 2010).



**Figura 36** – Difratograma de Raio-X da quitosana *in Natura* e modificadas

Reinas e colaboradores (2014) ao caracterizar por DRX, microesferas de quitosana, associaram os sinais com  $2\theta$  em  $10^\circ$  e  $20^\circ$  à presença de cristais hidratados e anidros, respectivamente na fase cristalina da quitosana.

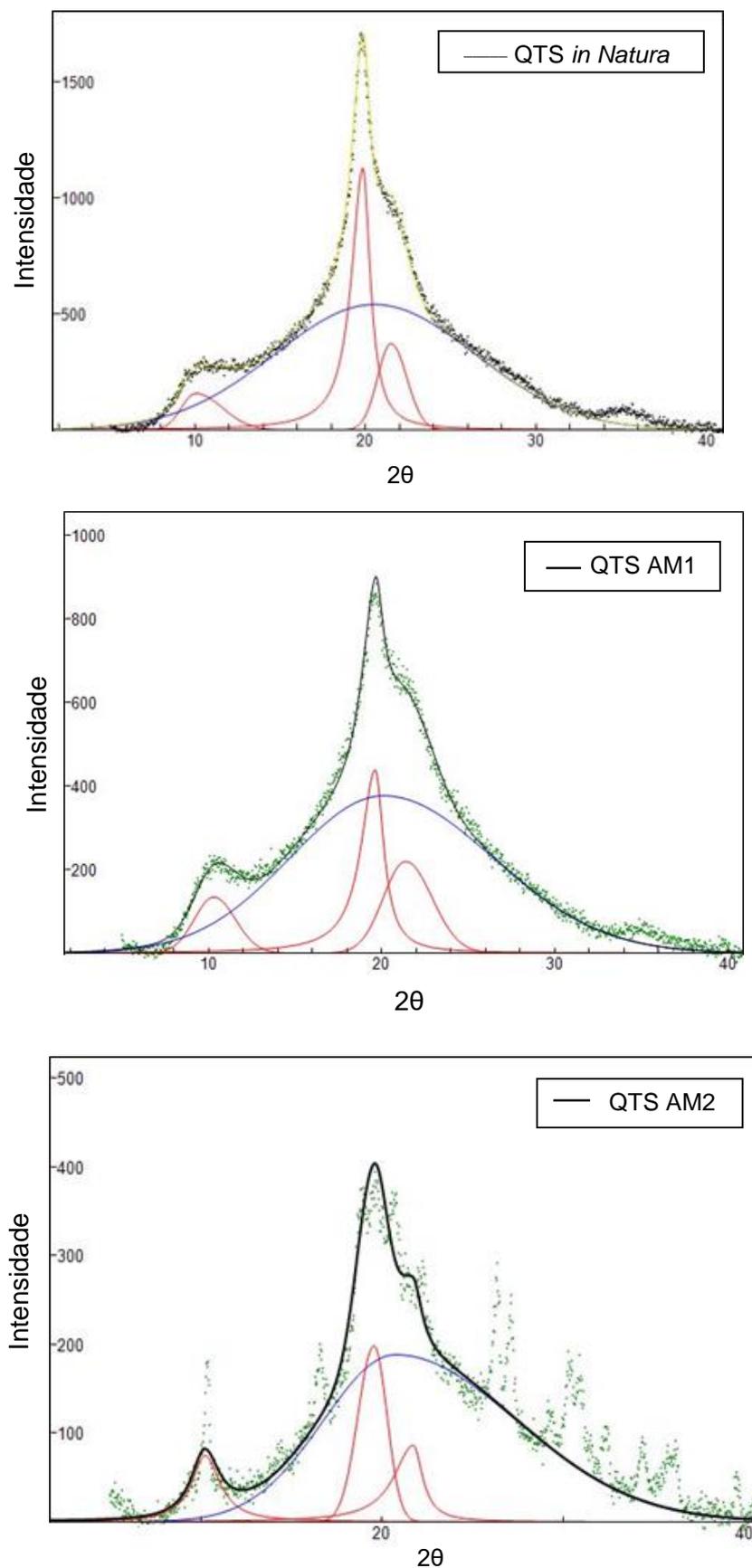
Os difratogramas de Raio-X para as amostras de microesferas de quitosana modificada em seco, QTS-AM1 e QTS-AM3, (Figura 36) não mostram deslocamentos significativos dos planos apresentados pela quitosana *in Natura* nas microesferas, apenas se observa uma discreta maior definição do ombro observado em  $2\theta = 10,2^\circ$  (QTS-AM3) relativo ao plano 020 e a provável diminuição da definição do ombro referente ao plano 110, que provavelmente como consequência, houve a diminuição da cristalinidade da quitosana ocasionada pela interação com o EDC, que pode ter agido como agente reticulante (Cruz et al. 2016)

A amostra QTS-AM2 apresenta no difratograma de DRX a presença de sinais ao longo do difratograma provavelmente associados a ruído (“background”) que está associado ao preparo da amostra, no entanto é necessário considerar também que esta amostra foi modificada ainda úmida.

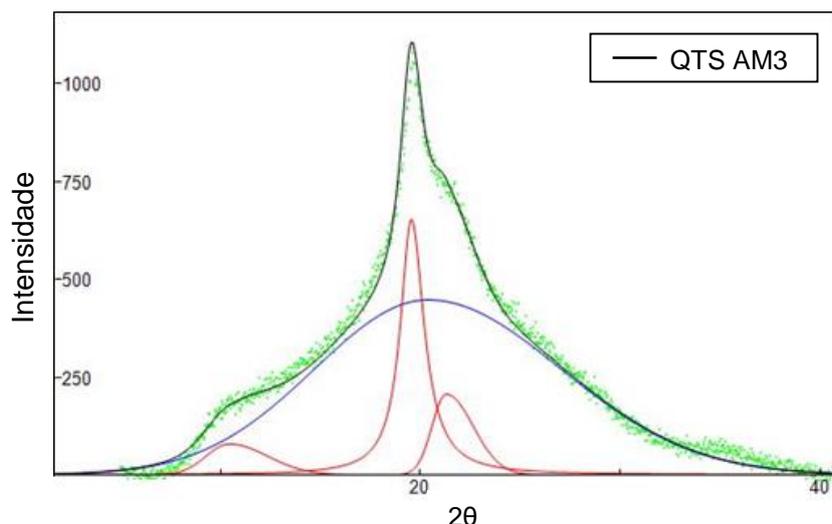
De acordo com Luyen et al., 1996 e Dantas et al., 2016; a quitosana apresenta três morfismos distintos: não-cristalina, cristalina hidratada e cristalina anidra. Assim sendo, a forma hidratada da quitosana apresenta um pico agudo no ângulo  $2\theta = 10,4^\circ$  e um pico fraco em  $2\theta = 20-22^\circ$ , tais características podem ser observadas na amostra QTS AM2 (Figura 36).

Como consequência da via úmida de preparação também se observou um aumento da cristalinidade em relação às outras amostras de microesferas (Cruz, 2016).

O valor da cristalinidade das microesferas de quitosana sem modificar (*in Natura*) e modificada (AM1, AM2 e AM3), foram calculados a partir da técnica de deconvolução das áreas associadas a cada fase como mostrado nas Figuras 37 e 38, são apresentadas na Tabela 9.



**Figura 37** – Deconvolução dos picos de difração das amostras de quitosana *in Natura* e das quitosanas modificadas (QTS AM1 e QTS AM2).



**Figura 38** – Deconvolução dos picos de difração da amostra de quitosana modificada (QTS AM3).

**Tabela 9** – Grau de cristalinidade da quitosana *in Natura* e das microesferas de quitosanas modificadas\*.

Amostras	Xc (%)
QTS <i>in Natura</i>	31,4
QTS-AM1	29,0
QTS-AM2	35,0
QTS-AM3	25,0

\*Para amostras modificadas com EDC (QTS-AM) não tem sido reportado percentagens de cristalinidade com anterioridade na literatura consultada.

A cristalinidade da quitosana está estreitamente ligada ao processo de desacetilação da quitina o qual origina um polímero com uma distribuição de unidades acetiladas irregular na cadeia e conseqüentemente uma quitosana de menor cristalinidade que a quitina (Cardenas et al., 2004; Ogawa et al., 2004; Santos, 2006).

Sendo assim, como todas as microesferas das amostras objeto de estudo partem de uma quitosana produzida num mesmo lote comercial (Aldrich), todas apresentaram a mesma distribuição dos grupos acetilados na cadeia polimérica e o mesmo grau de desacetilação pelo que as mudanças observadas na cristalinidade (Tabela 9) necessariamente estão associadas ao processo de

modificação com EDC. Descartamos possíveis alterações no grau de desacetilação neste processo com EDC partindo dos resultados encontrados a partir da análise FTIV (página 67) no qual não se observaram mudanças significativas no grau de desacetilação da quitosana das amostras QTS-AM após o tratamento com EDC.

A amostra de QTS-AM2 apresentou maior valor de cristalinidade, (35%) que a QTS *in Natura* (31,4%) e que as amostras modificadas por via seca (29-25%). Este aumento observado na cristalinidade da quitosana nas microesferas modificadas por via úmida, está associado à maior mobilidade das cadeias poliméricas nesta etapa do processo que permitiu uma melhor organização das cadeias favorecendo a formação de fase cristalina e concomitantemente também favoreceu a difusão do EDC nas microesferas possibilitando a modificação nas camadas mais internas das microesferas (Leceta et al., 2013; Pastor et al., 2013; Reinas et al. 2014).

Já as amostras QTS AM1 e QTS AM3, respectivamente apresentaram valores mais baixos (29 – 25%), em comparação com a QTS *in Natura*. Provavelmente como consequência, houve a diminuição da cristalinidade da quitosana ocasionada pela interação com o EDC, que pode ter agido como agente reticulante, impossibilitando o rearranjo das cadeias poliméricas (Cruz et al. 2016).

A baixa cristalinidade dos suportes para a imobilização de enzimas é mais favorável para a utilização em processos de transesterificação em leitos fluidizados, pois materiais com alto grau de cristalinidade caracteriza uma estrutura frágil, que quando submetidos aos processos através de leito fluidizados, o atrito pode levar a destruição do suporte que, como consequência, acarretará na perda da enzima.

#### 4.6 – DINÂMICA MOLECULAR DA QUITOSANA NAS MICROESFERAS

Os resultados ilustrados na Tabela 10, indicam o comportamento dinâmico molecular da quitosana nas microesferas, utilizando as diferentes metodologias de modificação (QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3) e da quitosana

*in Natura*. Estes dados geram respostas sobre a mobilidade molecular do polímero. Nestas medidas os parâmetros  $T_{1H}$  (1) e  $T_{1H}$  (2), indicam os valores de relaxação spin-rede para as amostras de quitosana modificadas e *in Natura*.

**Tabela 10** - Tempo de Relaxação spin-rede das amostras de quitosana com 2 exponenciais.

<b>Amostra</b>	<b><math>T_{1H}</math> (1)</b>	<b><math>T_{1H}</math> (2)</b>
QTS ( <i>in Natura</i> )	3	53
QTS-AM1	2	56
QTS-AM2	3	38
QTS-AM3	3	63

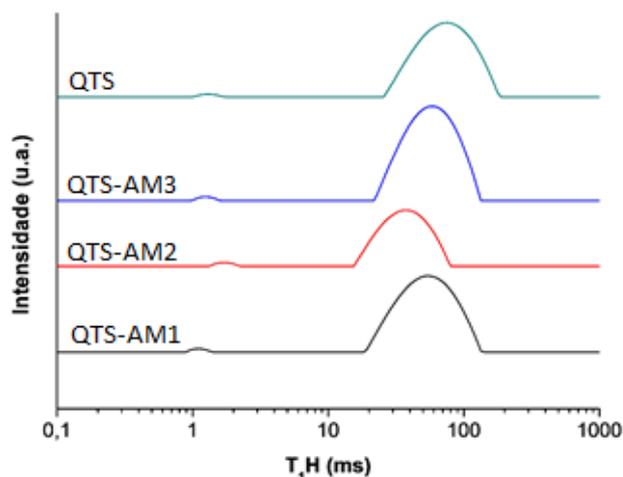
Em relação aos valores apresentados por  $T_{1H}$  (1), um menor valor, indica a presença de umidade normalmente absorvida pelo polímero. Já os valores encontrados por  $T_{1H}$  (2), indica uma estrutura de maior massa molar, que apresenta uma estrutura que pode ser rígida e heterogênea.

Os resultados de  $T_{1H}$  (2) 53ms e 56ms para a amostra de QTS *in Natura* e QTS-AM1 respectivamente são relativos a um comportamento semelhante, indicando que a modificação realizada, não afetou diretamente a mobilidade da estrutura do polímero.

No entanto, no caso da QTS-AM2, o valor encontrado para  $T_{1H}$  (2) de 38ms, o menor deles, indicou uma maior mobilidade em comparação com as demais, que pode estar associado a um efeito de recristalização secundária da carbodiimida com o polímero, tendo a formação de cristais menores.

Observa-se ainda que para amostra QTS-AM2, ocorreu o deslocamento da curva de domínio (Figura 39), este comportamento, intercorreu devido ao desprendimento de água presente nessas microesferas – uma vez que elas foram modificadas úmidas e tendo quantidade maior de água adsorvida – resultando assim, possíveis rearranjos moleculares e interações inter e intramoleculares diferentes das demais amostras utilizadas depois de secas

(Oliveira et al. 2015) esta interpretação está em concordância com os resultados encontrados na análises de DRX (Figura LL) para QTS AM2.



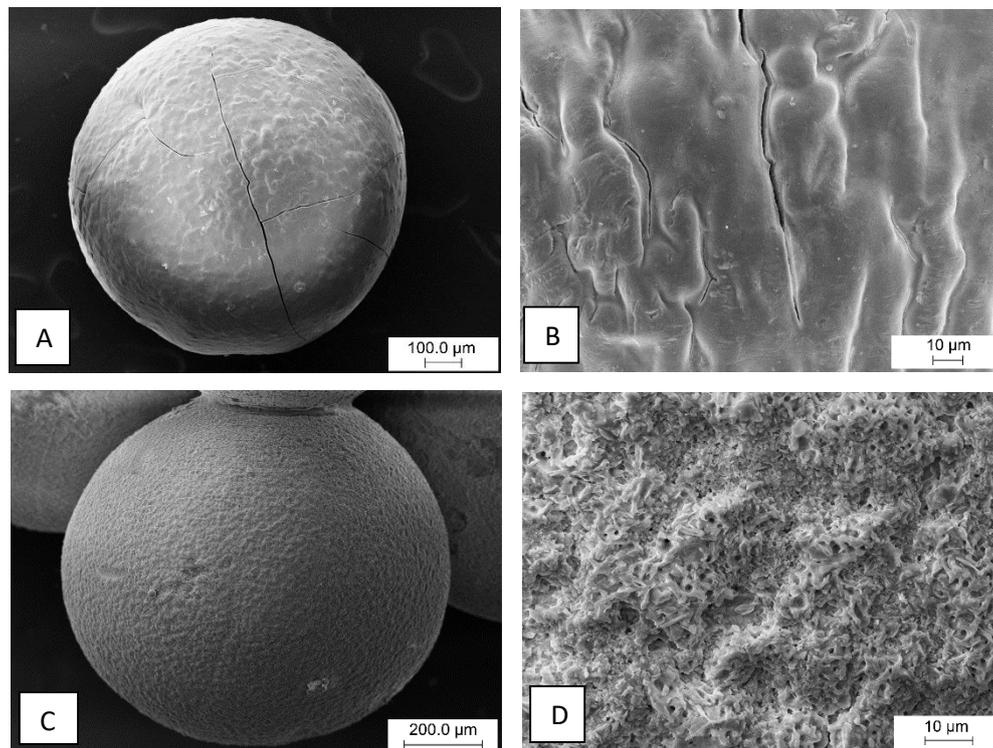
**Figura 39** - Curva de domínios das microesferas de quitosana

O valor identificado para QTS-AM3 do  $T_{1H}$  (2) de 63ms para a modificação a QTS, utilizando maior concentração de EDC e maior tempo de tratamento, indicou um aumento significativo no tempo de relaxação spin-rede em relação as outras amostras modificadas e *in Natura*. Evidenciando então, uma amostra com menor mobilidade, próprio de um material com estrutura mais rígida e heterogênea provavelmente originada pela interação do modificador bifuncional com os sítios ativos da quitosana (hidroxilos e aminos).

#### 4.7 – MORFOLOGIA E DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO DOS SUPORTES QTS *in Natura* E MODIFICADOS QTS-AM.

A partir das imagens registradas para os diferentes suportes com a técnica de MEV, foi possível observar que os suportes formulados (Figura 40 e 41) apresentaram morfologia esférica regular sem presença de caldas, conforme esperado pelos ajustes realizados nos parâmetros para obtenção das microesferas por coagulação, tais como: altura da queda da gota na solução coagulante, a velocidade do gotejamento e a velocidade de agitação. A obtenção de uma morfologia esférica regular, evita o aparecimento de caminhos preferencias, quando as microesferas são utilizadas no reator de leito fluidizado (Tuzmen et. al., 2010; Román, 2015).

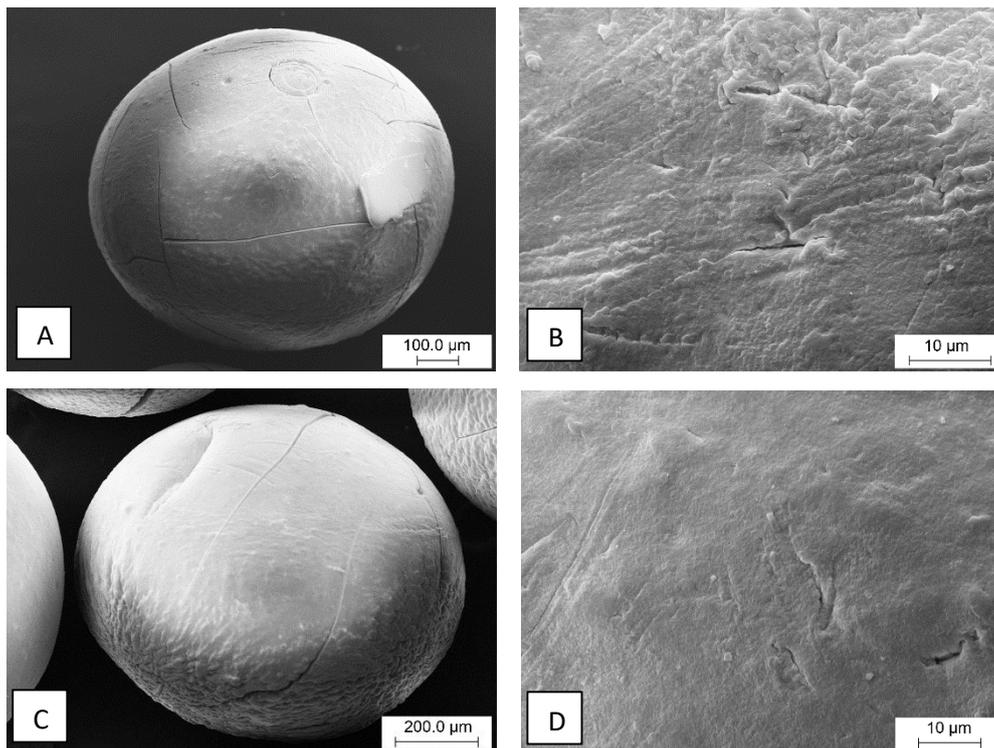
Os suportes de QTS e QTS-AM2 (Figura 40 A e C) apresentam diferenças na textura de suas superfícies.



**Figura 40** – Micrografia eletrônica A) microesfera de QTS B) superfície da microesfera QTS; C) microesfera de QTS-AM2, D) superfície da microesfera QTS-AM2.

No suporte de QTS (Figura 40A e B) se observam rachaduras e uma superfície densa associada a concentração utilizada de NaOH no meio coagulante (Godoi, 2013; Beppu et al. 1999), já a superfície do suporte modificado QTS-AM2 (Figura 39C e D) não apresenta rachaduras e a superfície é regularmente porosa. Estas características das microesferas QTS-AM2 podem estar ligadas ao processo de formação das microesferas entumecidas nas quais a presença da água deve reduzir a taxa de cristalização e a migração da água condiciona a textura da superfície.

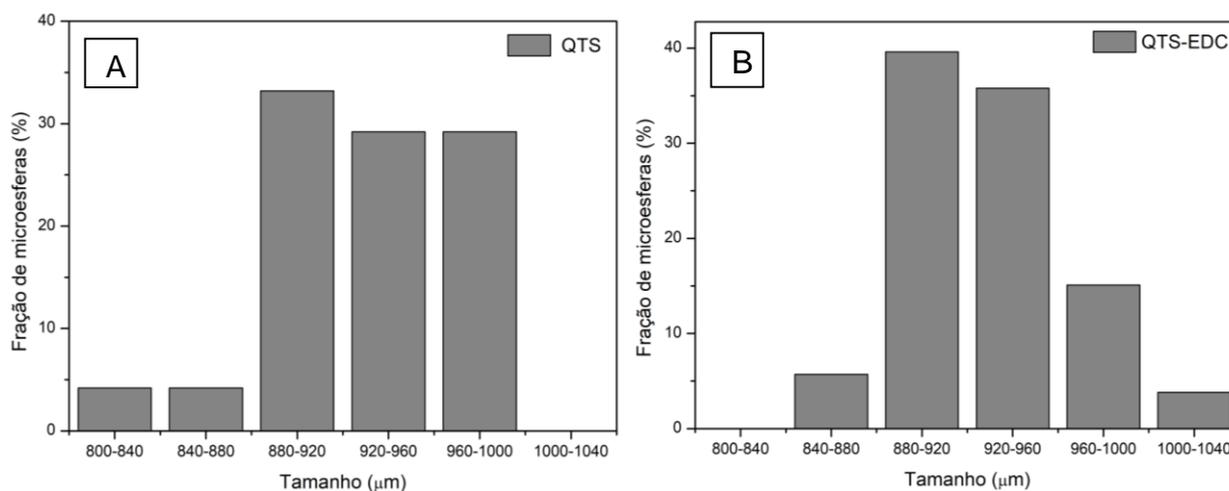
A superfície dos suportes ativados como EDC, pelas metodologias 1 (QTS-AM1) (Figura 41B) e 3 (QTS-AM3) (Figura 41D), apresentam um aspecto mais denso que QTS-AM2 e não se observam as camadas existentes na microesfera da QTS.



**Figura 41** – Micrografia eletrônica A) microesfera modificada QTS-AM1 B) superfície da microesfera QTS-AM1; C) microesfera modificada QTS-AM3, D) superfície da microesfera QTS-AM3.

Essa diferença pode ter sido ocasionada pelas distintas concentrações das soluções modificadoras e o tempo de reação, uma vez que para a metodologia 3 (QTS-AM3), a concentração da solução de EDC ( $3 \times 10^{-4} \text{ mol/L}$ ) e o tempo de modificação (30min) foram maiores em comparação as outras amostras, com isso favoreceu a formação de uma superfície mais densa.

Os suportes formulados apresentaram uma distribuição de tamanho representada pelos gráficos mostrados na Figura 42. Se observam pequenas diferenças nas distribuições de tamanho entre o suporte de QTS (Figura 40 A) e os suportes modificados (Figura 41 B) que podem ser representados num único gráfico de distribuição por não ter sido observada mudanças na distribuição de tamanho dos suportes QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3 como consequência do processo de modificação com EDC.



**Figura 42** – Distribuição de tamanho dos suportes de QTS (A) e QTS-EDC (B) (média dos resultados das amostras QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3).

**Tabela 11** – Valores da distribuição de tamanho dos suportes de QTS *in Natura* e QTS-EDC\*

Suporte	Distribuição de tamanho					
	800-840μm	840-880μm	880-920μm	920-960μm	960-1000μm	1000-1040μm
QTS <i>in Natura</i>	4,2%	4,2%	33,2%	29,2%	29,2%	0
QTS-EDC*	0	5,7%	39,6%	35,8%	15,1%	3,8%

\*Tamanho médio das amostras QTS-AM1, QTS-AM2 e QTS-AM3)

A principal diferença entre as microesferas de QTS e QTS modificadas (QTS-EDC) está na distribuição mais estreita apresentada nos suportes após modificação com EDC para as quais aproximadamente 75% das microesferas apresentaram um diâmetro entre 880 e 920 μm no lugar do 62% para as preparadas com a QTS sem modificar, (Tabela 11) valor que está dentro da faixa de valores reportados para microesferas obtidas por a metodologia de coagulação (Dias et al. 2008).

A distribuição de tamanho considerada média (840-1000μm) é apropriada para o uso pretendido em reatores de leite fluidizado com estabilização magnética externa, já que deve diminuir os efeitos negativos ocasionados pelo

estabelecimento de caminhos preferenciais no reator (Ngo et. al. 2012; Román, 2015).

Os resultados reportados para as metodologias utilizadas neste trabalho nos levaram a selecionar as condições de modificação com EDC das microesferas de QTS por via úmida e concentração de EDC de  $3,7 \times 10^{-4}$  mol /L

Desta forma as análises do rendimento de imobilização e o efeito do pH e da temperatura sob a atividade catalítica do suporte, foi realizado através da formulação de suprote nas condições anteriormente citadas e denominado apenas como QTS-EDC.

#### 4.8 – RENDIMENTO DA IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE AMANO AK NOS SUPORTES QTS-EDC

Diferentes protocolos de ativação foram estudados para a imobilização da lipase Amano AK nos suportes a base de quitosana objeto de estudo avaliando a percentagem de enzima imobilizada (rendimento) aspecto de particular relevância desde o ponto de vista econômico e técnico considerando o impacto que pode vir a ter na atividade e estabilidade operacional (Silva et al., 2016)

Estes protocolos consistem em diferentes metodologias de ativação dos suportes para posterior imobilização da lipase (ativação) (pg. 46);

- Metodologia I  
Os grupos hidroxila da quitosana foram modificados (ativados) com EDC.
- Metodologia II  
Os grupos hidroxila da quitosana foram modificados (ativados) com EDC e posteriormente os grupos amino da quitosana são ativados com uma solução de GLU.
- Metodologia III – Este método consiste ao inverso da metodologia II, modificar primeiro os grupos amino com o GLU e posteriormente realizar a modificação dos grupos hidroxila da quitosana com o EDC.

Logo após todo o processo envolvendo a metodologia de formulação dos três distintos suportes (QTS-AM), se realizou o processo de imobilização da lipase Amano AK conforme o item 3.2.6 na página 53.

De acordo com a tabela 12, observa-se ver que os rendimentos de imobilização para os 3 distintos protocolos de imobilização foram semelhantes e superiores ao 50% em relação a enzima livre e condicentes com os reportados na literatura.

**Tabela 12** – Rendimento de imobilização e atividade da lipase imobilizada preparada por três diferentes protocolos de imobilização binária

Amostras	P <sub>0</sub> (mg/mL)	P <sub>1</sub> (mg/mL)	Rendimento (%)
Enzima Livre	0,413926	0	--
QTS-EDC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,413926	0,184244	55,5
QTS-EDC-GLU/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,413926	0,183251	55,7
QTS-GLU-EDC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	0,413926	0,178412	56,9

P<sub>0</sub> – do teor de proteína presente na solução inicial;

P<sub>1</sub> – quantidade de proteína residual presente no sobrenadante.

Silva, 2007 ao utilizar o GLU como agente ativador ao utilizar uma concentração semelhante ao deste trabalho, alcançaram um resultado de 52,4% de imobilização.

Geralmente quando os valores de rendimento de imobilização resultam em valores mais elevados, suponha-se que haja um melhor rendimento da atividade enzimática, no entanto, em sistemas com alta carga de enzimas imobilizada, podem acontecer limitações difusionais e impedimento estérico enzimático (Gonçalves et al., 1997; Silva, 2007; Xie et al., 2010).

A ligação entre a quitosana e o EDC, ocorre mais facilmente pelo seu maior acesso aos grupos hidroxila do suporte. Pois com a formação de um complexo acilissourea (Hun et al, 2003; Chiou et al., 2004; Lau et al., 2014), por ser molécula menor, é mais reativo, tornando o suporte bastante promissor para a imobilização da enzima (Hun et al, 2003; Silva, 2007, Xie et al., 2010).

A estratégia de introduzir o GLU como segundo agente ativador, para obter assim, aumento dos sítios ativos e proporcionar um maior rendimento de

imobilização, não foi eficiente em comparação com o suporte ativado apenas com EDC. A explicação para a obtenção de rendimentos de imobilização semelhantes para a lipase em relação as metodologias II (55,7%) e III (56,9%), pode ser consequência da interação do EDC com o GLU nas condições utilizadas, uma vez que os grupos amino primários do EDC podem reagir com os grupos aldeídos do GLU (Hun et al, 2003). Um outro fator que pode contribuir é a formação de ligações cruzadas com presença do GLU ocasionando impedimentos estéricos na superfície do suporte que possam afetar o acesso da enzima (Silva, 2007).

Hung e seus colaboradores ao ativar simultaneamente suportes de quitosana com EDC e GLU, obtiveram um rendimento médio de 25,2%, valor este menor que reportado no presente trabalho.

#### 4.9 – EFEITO DO PH E DA TEMPERATURA NA ATIVIDADE CATALÍTICA DOS BIOCATALISADORES FORMULADOS

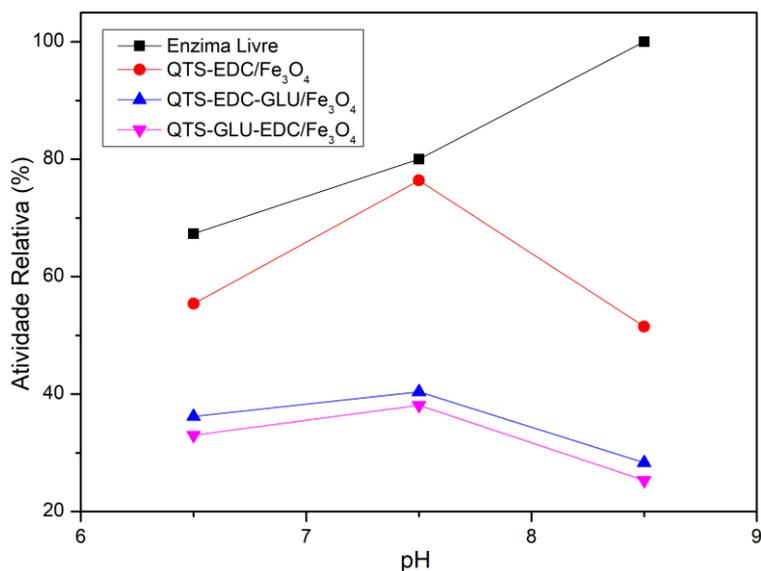
Através dos ensaios para determinação da atividade hidrolítica da enzima lipase imobilizada numa emulsão do azeite de oliva, foi avaliado o efeito do pH do meio reacional sob a atividade relativa da enzima imobilizada nos suportes a base de QTS (Tabela 13).

**Tabela 13** – Efeito da variação do pH sob a atividade relativa da enzima livre e imobilizada.

Amostra	Atividade relativa (%)*		
	pH 6,5	pH 7,5	pH 8,5
Enzima Livre	67,3	80	100
QTS-EDC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	55,4	76,2	51,5
QTS-EDC-GLU/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	36,2	40,4	28,3
QTS-GLU-EDC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	33,0	38,1	25,3

\*Processo reacional a 40°C

A enzima imobilizada apresentou uma atividade relativa alta em comparação à da lipase livre.



**Figura 43** – Efeito do pH sob a atividade relativa das enzimas imobilizadas  
A) pH6,5 B) pH7,5 e C) pH8,5.

Após o processo de imobilização da lipase AK, o pH no qual a atividade foi maior passou de 8,5 para 7,5 (Tabela 13, Figura 43). Esta mudança da atividade catalítica no qual os valores maiores estão associados a um meio ácido é encontrada, em geral, quando enzimas são imobilizadas a suportes polcatiônicos como a QTS (Hung et al., 2013).

Analisando o processo de imobilização, em todos os casos, onde houve a variação do pH 6,5; 7,5; 8,5; o primeiro suporte magnético de quitosana modificada com cardodiimida (QTS-EDC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) teve o melhor resultado, obtendo assim respectivamente os seguintes valores: 55,4; 76,2; 51,5%.

Para os suportes (QTS-EDC-GLU/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) (QTS-GLU-EDC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) o melhor resultado encontrado nessa relação foi na faixa de pH 7,5 tendo um valor da atividade relativa de 40,4% e de 38,1% respectivamente (Tabela 13, Figura 43).

No estudo de suportes de QTS ativados com GLU e imobilizada a lipase AK, Fonseca (2013) e Rónan (2015) reportaram atividades relativas a pH 7 de 45,7% e 37,5% respectivamente as quais são marcadamente inferiores a atividade do biocatalisador utilizando como suporte QTS-EDC.

O efeito da temperatura sobre a atividade das enzimas imobilizadas é apresentado na Tabela 14.

**Tabela 14** – Efeito da variação da temperatura sob a atividade relativa da enzima livre e imobilizada.

Amostra	Atividade relativa (%)*			
	30°C	40°C	50°C	60°C
Enzima Livre	51,8	80	27,8	17,2
QTS-EDC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	45,5	76,2	35,6	37,2
QTS-EDC-GLU/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	34,2	40,4	25,8	28,0
QTS-GLU-EDC/Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	30,5	38,1	26,2	28,0

\*Processo reacional em pH7,5

A temperatura na qual se alcança a maior atividade catalítica da lipase AK é a mesma encontrada para a enzima livre, 40°C.

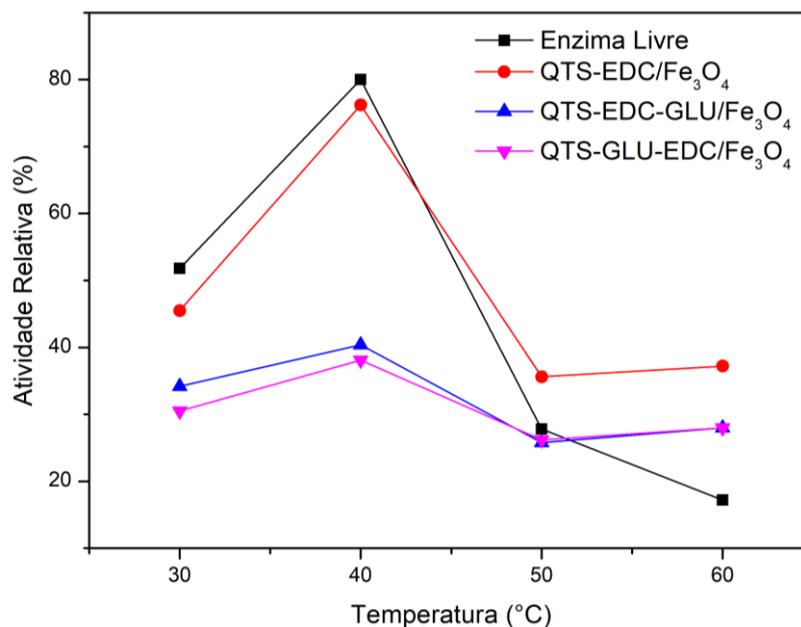
Se observa que houve uma diminuição drástica do valor da atividade relativa da enzima livre acima dos 40°C o qual esta associado a desnaturação parcial das enzimas. Nota-se que este processo resulto ser menos crítico para as enzimas imobilizadas indicando que com a imobilização a lipase passou ser mais termicamente estável.

A comparação das atividades relativa da lipase imobilizada nos distintos suportes, denota que o suporte QTS-EDC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apresenta os melhores resultados na atividade catalítica alcançando 76,2% em relação a enzima livre a 40°C.

Já com a introdução do GLU como o segundo agente ativador dos suportes de quitosana, a atividade relativa foi menor em comparação com o suporte ativado apenas com EDC. Para todas as temperaturas utilizadas os suportes QTS-EDC-GLU/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e QTS-GLU-EDC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apresentaram atividades relativas inferiores, porém vale ressaltar que para estes suportes a temperatura ótima de atuação também foi 40°C.

Vale ressaltar que a 60°C, os suportes QTS-EDC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (37,2%), QTS-EDC-GLU/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (28%) e QTS-GLU-EDC/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (28%) alcançaram valores da atividade relativa superiores a enzima livre (17,2%) resultado que indica que a utilização conjunta destes ativadores tornam menos influenciada a atividade relativa da lipase AK pelas mudanças de temperatura.

Uma forma comparativa de mostrar a influência da temperatura (30°C, 40°C, 50°C e 60°C) na atividade relativa reportada na Tabela 14 para as enzimas imobilizadas nos suportes objeto de estudo, pode ser apreciada na Figura 44.



**Figura 44** – Efeito da temperatura sob a atividade relativa da lipase Amano AK livre e imobilizada.

Vários outros autores citam em seu trabalho, que a temperatura ideal de reação da lipase Amano AK, quando imobilizada em um determinado suporte tende a ficar estável à 40°C, assim sendo:

Bôa Morte, 2017, por meio da ativação com glutaraldeído, foi possível imobilizar a enzima *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), em um suporte de quitosana contendo núcleo magnético. Onde, através da hidrólise da emulsão do azeite de oliva, obtiveram 46,3% da atividade relativa, tendo a temperatura ideal de atividade a 40°C.

Román, 2015; estudou a produção de biodiesel por um método não convencional, neste caso, utilizou a enzima *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), imobilizada em um suporte de quitosana com propriedades magnéticas, por ligação covalente com epícloridrina. Por meio da atividade da hidrólise da emulsão do azeite de oliva, a uma temperatura de 40°C, alcançaram 8,2% da atividade relativa.

Tintor, 2014, estuda a produção de etil-ésteres de ácidos graxos (EEAGs) através da transesterificação de resíduo de óleo de fritura, por meio da catalise da lipase microbiana de *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), imobilizada em um suporte de polihidroxibutirato (PHB), por adsorção física. Através da hidrólise de emulsão de azeite a máxima atividade hidrolítica para a enzima livre, foi de 6883U/g a 50°C, já para a enzima imobilizada, a mesma obteve a temperatura ideal de atividade a 40°C, tendo em média 80% da atividade relativa.

Marum, 2013; estudou o impacto da atividade da enzima *Pseudomonas fluorescens* (Lipase AK), imobilizada covalentemente por meio da ativação com epicloridrina em um suporte de quitosana com propriedades magnéticas. Através da atividade hidrolítica da emulsão do azeite de oliva, tiveram 70% da atividade relativa, tendo a temperatura fixada a 40°C

A enzima imobilizada tem perda da sua atividade, decorrente do processo de imobilização, onde a ligação covalente formada entre a enzima e o suporte, pode ocasionar restrições conformacionais na estrutura da enzima, fazendo com que existem restrições em relação a exposição do sitio ativa ao substrato (Gudhe et al., 2015; Poppe et al., 2015; Marum, 2013).

Os resultados alcançados no estudo da influencia do pH e da temperatura sobre a atividade relativa da enzima livre e imobilizada, indicam que a imobilização da lipase Amano AK nos suportes de quitosana ativados com EDC quando utilizadas as condições estabelecidas no presente trabalho são adequados para seu uso em reações de transesterificação e promissores para sua utilização em reatores de leito fluidizados com campo magnético externo.

## CAPITULO 5 – CONCLUSÕES

As condições utilizadas para a formulação das microesferas de quitosana contendo nanomagnetita apresentou as propriedades magnéticas desejadas, morfologia esférica regular e distribuição de tamanho de partícula com aproximadamente o 70% localizadas entre 880-920  $\mu\text{m}$ .

As metodologias de modificação com EDC por via seca e úmida, nas condições estabelecidas, originaram modificações nos agrupamentos hidroxilas a consequência da ativação com EDC como constatado com as técnicas de FTIV e TGA-MS. A modificação ainda foi verificada a partir da menor perda de água registrada na análises termogravimétrico em relação a QTS próprio da diminuição de hidrofiliabilidade originada na QTS-EDC.

A metodologia por via úmida propiciou uma maior cristalinidade no suporte QTS modificado com EDC sem originar mudanças no grau de desacetilação da QTS de partida e apresentando uma estrutura de maior mobilidade molecular que a QTS conforme constatado a partir dos tempos de relaxação (RMN). Resultado que foi a base para a formulação QTS-EDC utilizada nas medidas de atividade relativa.

As formulações QTS-EDC independentemente da metodologia de modificação utilizada apresentaram rendimentos de imobilização da Lipase AK superiores a 50% da enzima de partida.

O suporte QTS-EDC modificado por via úmida e com EDC ( $3,7 \times 10^{-4}$  mol/L) apresentaram atividade catalítica (76%) alta em relação a literatura a pH 7,5 e 40°C. A introdução de um segundo ativador (GLU), na formulação do suporte a base de quitosana, diminui sua eficiência, entre tanto torna a lipase AK menos sensível a mudança de atividade com variações de pH e temperatura.

O estudo realizado deixa estabelecida a metodologia de modificação com EDC para a formulação de biocatalisadores com relativo alto rendimento de imobilização e atividade catalítica relativa superior às reportadas para modificações com GLU e Lipases imobilizadas covalentemente.

## RECOMENDAÇÕES PARA ESTUDOS FUTUROS

Como continuidade da pesquisa abordada no presente trabalho é sugerido;

1. Continuar o estudo da modificação utilizando agentes modificadores bifuncionais avaliando o impacto na hidrofobicidade da superfície e atividade catalítica relativa da Lipase AK.
2. Estudar as possíveis interações entre as enzimas imobilizadas em função do sítio de ativação e as condições experimentais de imobilização assim como seu impacto na atividade catalítica relativa.

## CAPÍTULO 6 – REFEREÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA

AARTHY, M.; Saravananb, P.; Gowthamana, M. K.; Rosea, C.; Kaminia, N. R. Enzymatic transesterification for production of biodiesel using yeast lipases: An overview. **Chemical Engineering Research and Design**. vol. 92 p. 1591–1601, 2014.

ABDELAAL, M. Y.; Sobahi, T. R. A.; Makki, M. S. I. Chemical modification of Chitosan for metal ion removal. **Arabian Journal of Chemistry**. vol. 7, p. 741–746, 2014.

ABDEL-RAHMAN, R.M.; Hrdina, R.; Abdel-Mohsen, A.M.; Fouda, M.M.G.; Soliman, A.Y.; Mohamed, F.K.; Mohsin, K.; Pinto, T.D. Chitin and chitosan from Brazilian Atlantic Coast: Isolation, characterization and antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. Vol. 80, p. 107–120, 2015.

ABIGOR, R. D.; Uadia, P. O.; Foglia, T. A.; Hass, M. J.; Jones, K. C.; Okpefa, E.; Bafor, M. E. Lipase-catalysed production of biodiesel fuel from some Nigerian lauric oils. **Biochem. Soc. Trans.** vol. 28, p. 979 – 981, 2000.

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**, Vol. 32, n. 1, p. 15, 2010.

AGUIEIRAS, E. C.G.; Oliveira, E. D. C.; Freire, D. M. G. Current status and new developments of biodiesel production using fungal lipases. **Fuel**. vol. 159, p. 52–67, 2015.

ALMEIDA, R.R.; Damasceno, E.T.S.; Carvalho, S.Y.B.; Carvalho, G.S.G, Gontijo, L.A.P.; Guimarães, L.G.L. Chitosan nanogels condensed to ferulic acid for the essential oil of *Lippia organoides* Kunth encapsulation. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 188, p. 268–275, 2018.

ALOULO, A.; Puccinelli, D.; De Caro, A.; Leblond, Y.; Carrière, F. A comparative study on two fungal lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Yarrowia lipolytica* shows the combined effects of detergents and pH on lipase adsorption and activity. **Biochimica et Biophysica Acta**. vol. 1771, p. 1446–1456, 2007.

ALVARENGA, Elson Santiago. Characterization and Properties of Chitosan, **Biotechnology of Biopolymers**, p. 91-108, 2011.

ANDRADE, S.M.B.; Ladchumananandasivam, R.; Nascimento, R.M. Extração e caracterização de quitina e quitosana e a sua utilização na fabricação de nanofibras. **VI NATIONAL CONGRESS OF MECHANICAL ENGINEERING**. Campina Grande – Paraíba – Brazil, August 18 – 21, 2010.

ARANAZ, I., Harris, R., García, F.N., Heras, A., Acosta, N. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 146, p. 402–410, 2016.

ARAÚJO, P.M.A.G., Santos, P.T.A.; Costa, A.C.F.M., Araújo, E.M. **in 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais**, Natal-RN, 2012.

ARICA, M. Y.; Altintas, B.; Bayramoglu, G. Immobilization of laccase onto spacer-arm attached non-porous poly(GMA/EGDMA) beads: Application for textile dye degradation. **Bioresource Technology**. vol. 100 p. 665–669, 2009.

ARUMUGAM, A. & PONNUSAMI, V. Biodiesel production from *Calophyllum inophyllum* oil using lipase producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within reticulated foams. **Renewable Energy**. vol. 64, p. 276-282, 2014.

ASHJARIA, M.; Mohammadi, M.; Badri, R. Chemical amination of *Rhizopus oryzae* lipase for multipoint covalent immobilization on epoxy-functionalized supports: Modulation of stability and selectivity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 115, p. 128–134, 2015.

ASSIS, O. B. G. & SILVA, V. L. Caracterização Estrutural e da Capacidade de Absorção de Água em Filmes Finos de Quitosana Processados em Diversas Concentrações. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 13, nº 4, p. 223-228, 2003.

ATHALYE, S.; Shivappa, R. S.; Peretti, S.; Kolar, P.; Davis, J. P. Producing biodiesel from cottonseed oil using *Rhizopus oryzae* ATCC #34612 whole cell biocatalysts: Culture media and cultivation period optimization. ***Energy for Sustainable Development***. vol. 17, p. 331–336, 2013.

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***, vol.2.3, p. 27-34, 2007.

BAJAJ, A.; Lohan, P.; Jha, P. N.; Mehrotra, R. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***. vol. 62, p. 9–14, 2010.

BALAN, Vera & VERESTIUC, Liliana. Strategies to improve chitosan hemocompatibility: A review. ***European Polymer Journal***. vol. 53, p.171–188, 2014.

BAN, K.; Kaieda, M.; Matsumoto, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. Whole cell biocatalyst for biodiesel fuel production utilizing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. ***Biochemical Engineering Journal***. vol. 8, p. 39–43, 2001.

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***, Vol.17, p. 4, 2014.

BARROS, F. C. F.; Cavalcante, R. M.; Carvalho, T. V.; Dias, F. S.; Queiroz, D. C.; Vasconcellos, L. C. G.; Nascimento, R. F. Produção e caracterização de esferas de quitosana modificada quimicamente. ***Rev. Iberoamer. Polím.***, vol.7(4), p. 232-246, 2006.

BEANEY, P., Lizardi-Mendoza, J., & Healy, M. Comparisons of chitins produced by chemical and bioprocessing methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, Vol. 80, p. 145–150, 2005.

BEPPU, M.M.; Arruda, E.J.; Santana, C.C. Síntese e Caracterização de Estruturas Densas e Porosas de Quitosana. ***Polímeros: Ciência e Tecnologia*** - Out/Dez – 1999.

BERGAMASCO, J.; Araujo, M. V.; Vasconcellos, A.; Filho, R. A. L.; Hatanaka, R. R.; Giotto, M. V.; Aranda, D. A. G.; Nery, J. G. Enzymatic transesterification of soybean oil with ethanol using lipases immobilized on highly crystalline PVA microspheres. ***Biomass and Bioenergy***. vol. 59, p. 218 – 233, 2013.

BHATT, A.S., Bhatt, D.K.; Santosh, M.S. Electrical and magnetic properties of chitosan-magnetite nanocomposites. ***Physica B***, Vol. 405, p. 2078-2082, 2010.

BISKUP, R.C., Jarosińska, D., Rokita, B., Ulański, P., Rosiak, J.M. Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparison of methods. ***Progress on Chemistry and Application of Chitin and Its ...***, Volume XVII, Polônia, 2012.

BÔA MORTE, Ellen de Freitas. **Suporte modificados com propriedades superparamagnéticas**. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2017, 119p.

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. Rio de Janeiro-RJ, 2008, 61p.

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

BRANCA, C., D'Angelo, G., Crupi, C., Khouzami, K., Rifici, S., Ruello, G., Wanderlingh, U. Role of the OH and NH vibrational groups in polysaccharide-nanocomposite interactions: A FTIR-ATR study on chitosan and chitosan/clay films. ***Polymer***, Vol. 99, p. 614-622, 2016.

BRUGNEROTTO, J., Lizardi, J., Goycoolea, F.M., Arguelles-Monal, W., Desbrières, J., Rinaudo, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. ***Polymer***, Vol. 42, p. 3569-3580, 2001.

BULSSAMARA, R.; Dall’Agnol, L.; Schrank, A.; Fernandes, K. F.; Vainstein, M. H. Optimal conditions for continuous immobilization of *Pseudozyma hubiensis* (Strain HB85A) lipase by adsorption in a packed bed reactor by response surface methodology. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***. 2009.

CAMACHO, A.P.M, Rocha, M.O.C, Brauer, J.M.E., Verdugo, A.Z.G., Félix, F.R., Ortega, M.M.C., Gómez, M.S.Y., Jatomea, M.P. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. ***Carbohydrate Polymers***, Vol. 82, p. 305–315, 2001.

CAMACHO, A.P.M.; Rocha, M.O.C.; J.M. Brauer, J.M.E.; Verdugo, A.Z.G.; Félix, F.R.; Ortega, M.M.C.; Gómez, M.S.Y.; Jatomea, M.P. Chitosan composite films: Thermal, structural, mechanical and antifungal properties. ***Carbohydrate Polymers***. Vol. 82, p. 305–315, 2010.

CANAKCI, Mustafa. The potential of restaurant waste lipids as biodiesel feedstocks. ***Bioresource Technology***. vol. 98, p. 183–190. 2007.

CARDOSO, Carmen Lúcia. Imobilização de enzimas em suportes cromatográficos: uma ferramenta na busca por substâncias bioativas. ***Quim. Nova***, Vol. 32, No. 1, 175-187, 2009.

CAROLINO, Adriano de Souza. **Estimativa do Percentual de Cristalinidade de Polímeros Semicristalinos derivados da Anilina através dos Padrões de Difração de Raios X**. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal do Amazonas. Manaus – AM, 2017, 88p.

CARVALHO, Elaine Aparecida Santos. **Caracterização estrutural e propriedades do (Acrilamidometil) acetato propionato de celulose modificado via radicalar**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2008, 64p.

CARVALHO, Elaine Aparecida Santos. **Formulação e caracterização de biocatalisadores com núcleo magnético a partir de polímeros naturais**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2012, 122p.

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**, Vol.XXII, n.3, p.303, 2012.

CASTANHARO, J.A., Ferreira, I.L.M., Costa, M.A.S., Silva, M.R., Costa, G.M., Oliveira, M.G. Microesferas magnéticas à base de poli (metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) obtidas por polimerização em suspensão. **Polímeros**, Vol. 25(2), p. 192-199, 2015.

CAVALHEIRO, E. T. G. Influência de fatores experimentais nos resultados de análises termogravimétricas. **Química Nova**, vol. 24, p. 612 – 615. 1995.

CHAGAS, M.B.; Nogueira, E.; Torres, A.; Silva, C.; Duarte, C. Caracterização das esferas de quitosana. **53º Congresso Brasileiro de Química**. Rio de Janeiro/RJ, de 14 a 18 de outubro de 2013. ISBN: 978-85-85905-06-4.

CHAKRABORTY, R.; Bepari, S.; Banerjee, A. Transesterification of soybean oil catalyzed by fly ash and egg shell derived solid catalysts. **Chemical Engineering Journal**. vol. 165, p. 798–805, 2010.

CHEN, G.; Ying, M.; Li, W. Enzymatic conversion of waste cooking oils into alternative fuel – biodiesel. **Appl. Biochem. Biotechnol.** vol. 129, p.129 – 132, 2006.

CHEN, P.H., Kuo, T.Y., Kuo, J.Y., Tseng, Y.P., Wang, D.M., Lai, J.Y., Hsieh, H.J. Novel chitosan–pectin composite membranes with enhanced strength, hydrophilicity and controllable disintegration. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 82, p. 1236–1242, 2010.

CHIOU, S. H. & WU, W. T. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups. **Biomaterials**. vol. 25, p. 197–204, 2004.

CHOU, S.F.; Luo, L.J.; Lai, J.Y.; Ma, D.H.K. Role of solvent-mediated carbodiimide cross-linking in fabrication of electrospun gelatin nanofibrous membranes as ophthalmic biomaterials. **Materials Science and Engineering C**. Vol. 71, p. 1145–1155, 2017.

CHRISTOPHER, L. P.; Kumar, H.; Zambare, V. P. Enzymatic biodiesel: Challenges and opportunities. *Applied Energy*. vol. 119, p. 497–520, 2014.

COELHO, Thalia Camila. *Estudos de adsorção de cobre (II) em microesferas de quitosana reticuladas com epiclorigrina e impregnadas com heparina*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC. 2006, 73p.

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*, Vol. 22, n.3, p. 260, 2012.

CROISIER, Florence & JÉRÔME, Christine. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. vol. 49, p. 780–792, 2013.

CRUZ, J. B.; Catão, C.D.S.; Barbosa, R.C.; Marcus Vinicius Lia Fook, M.V.L. Synthesis and characterization of chitosan scaffolds with antineoplastic agent. *Revista Matéria*. artigo 11686, p. 129-140, 2016.

CUNHA, P. L. R.; Paula, R. C. M.; Feitosa, J. P. A. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. *Quim. Nova*. vol. 32, nº. 3, p. 649-660, 2009.

DA RÓS, P. C. M.; Castro, H. F.; Carvalho, A. K. F.; Soares, C. M. F.; Moraes, F. F.; Zanin, G. M. Microwave-assisted enzymatic synthesis of beef tallow biodiesel. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 39, nº 4, p. 529-536, 2012.

DA RÓS, P. C. M.; Silva, W. C. E.; Grabauskas, D.; Pérez, V. H.; Castro, H. F. Biodiesel from babaçu oil: Characterization of the product obtained by enzymatic route accelerated by microwave irradiation. *Ind. Crops. Prod.*, vol. 52, p. 313 – 320, 2014.

DALLA-VECCHIA, R.; Nascimento, M. G.; Soldi, V. Aplicações sintéticas de lipase imobilizadas em polímeros. *Química Nova*. vol. 27, nº4, p. 623 – 630, 2004.

DANG, Q.; Liu, K.; Liu, C.; Xu, T.; Yan, J.; Yan, F.; Cha, D.; Zhang, Q.; Cao, Y. Preparation, characterization, and evaluation of 3,6-O-Nacetylene diamine modified chitosan as potential antimicrobial wound dressing material. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 180, p. 1–12, 2018.

DANTAS, M. J. L.; Fidéles, T. B. ; Carrodeguas, R. G.; Fook, M. V. L. Obtenção e caracterização de esferas de quitosana/hidroxiapatita gerada *in situ*. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 11, n. 1, p. 18–24, 2016.

DAVARPANA, S.; Mahmoodi, N. M.; Arami, M.; Bahrami, H.; Mazaheri, F. Environmentally friendly surface modification of silk fiber: Chitosan grafting and dyeing. **Applied Surface Science**. vol. 255, p. 4171–4176, 2009.

DENG, X.; Fang, Z.; Liu, Y-h. Ultrasonic transesterification of *Jatropha curcas* L. oil to biodiesel by a two-step process. **Energy Conversion and Management**. vol. 51, p. 2802–2807, 2010.

DEVI, N. & DUTTA, J. Int. J. Biol. Macromol. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.02.080> 2017.

DIAS, Francisco S., Queiroz, Danilo C. Um sistema simples para preparação de microesferas de quitosana. **Química Nova**, vol. 31, nº. 1, p. 160 – 163, 2008.

DIAS, L. H. P. V. **Aplicações de técnicas fototérmicas ao estudo de propriedades físicas de polímeros biodegradáveis**. Dissertação (Mestrado). Campos dos Goytacazes – RJ. Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF, 101 p. 2003.

DIZGE, N. & KESKINLER, B. Enzymatic production of biodiesel from canola oil using immobilized lipase. **Biomass and Bioenergy**. vol. 32, p. 1274–1278, 2008.

DIZGE, N.; Keskinler, B.; Tanriseven, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene–divinylbenzene copolymer. **Biochemical Engineering Journal**. vol. 44, p. 220–225, 2009.

DOCKAL, E. R.; Santos, J. E.; Soares, J. P.; Filho, S. P. C., Cavalheiro, E. T. G. Caracterização de Quitosanas Comerciais de Diferentes Origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 13, nº 4, p. 242-249, 2003.

DODI, G., Hritau, D., Lisa, G., Popa, M.I. Core-shell magnetic chitosan particles functionalized by grafting: Synthesis and characterization. **Chem. Eng. J.**, Vol. 203, p. 130-141, 2012.

DONG, C., Chen, W. & Liu, C. Preparation of novel magnetic chitosan nanoparticle and its application for removal of humic acid from aqueous solution. **Applied Surface Science**. Vol. 292, p. 1067–1076, 2014.

DORRAKI, N.; Safa, N. N.; Jahanfar, M.; Ghomia, H.; Siadat, S. O. R. Surface modification of chitosan/PEO nanofibers by air dielectric barrier discharge plasma for acetylcholinesterase immobilization. **Applied Surface Science**. vol. 349, p. 940–947, 2015.

DORS, G.; Freitas, L.; Mendes, A. A.; Junior, A. F.; Castro, H. F. Transesterification of Palm Oil Catalyzed by *Pseudomonas fluorescens* Lipase in a Packed-Bed Reactor. **Energy Fuels**. vol. 26, p. 5977–5982, 2012.

DOSSAT, V.; Combes, D.; Marty, A. Lipase-catalysed transesterification of high oleic sunflower oil. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 30, p. 90–94, 2002.

DUTTA, P. K.; Dutta, J.; Tripathi, V.S. Chitin and Chitosan: Chemistry, properties and applications. **Journal of Scientific & Industrial Research**. vol. 63, p. 20-31, 2004.

EDGAR, K. J., Buchaman, C. M., Debenham, J. S., Rundquist, P. A., Seiler, B. D., Shelton, M. C., Tindall, D. Advanced in cellulose ester performance and application. **Progress in Polymer Science**, vol. 26, p. 1605 – 1688, 2010.

EIRAS, C.; Passos, I. N. G., de Brito, A. C. F.; Júnior, J. R. S.; Zucolotto V.; Junior, O. N. O.; Kitagawa, I. L.; Constantino, C. J. L.; Cunha, H. N. Nanocompósitos eletroativos de poli-o-metoxianilina e polissacarídeos naturais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 5, p. 1158-1162, 2007.

FERREIRA, L. E. J.; Fiorotti, J. L.; Halasz, M. R. T. Quitosana: produção e estudo de parâmetros relevantes através de métodos viáveis. VIII Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica. Uberlândia, Minas Gerais, Brasil, 2009.

FILHO, P. B; Mattoso, L. H. C. Estudo de polímeros por microscopia de força atômica. **Comunicado Técnico. Embrapa**. São Carlos – SP. Ed 1ª. P. 1 – 4, 2003.

FOGLER, H. Scott. **Elementos de engenharia das reações químicas**. 4.ed. Rio de Janeiro – RJ: LTC, 2012.

FREITAS, L.; Da Rós, P. C. M; Santos, J. C.; de Castro, H. F. An integrated approach to produce biodiesel and monoglycerides by enzymatic interestification of babassu oil (*Orbinya sp*). **Process Biochemistry**. vol. 44, p. 1068–1074, 2009.

GARRIDO, I.Q.; González, V.I.; Arechederra, J.M.M.; Rienda, J.M.B. The role played by the interactions of small molecules with chitosan and their transition temperatures. Glass-forming liquids: 1,2,3-Propantriol (glycerol). **Carbohydrate Polymers**. Vol. 68, p. 173–186, 2007.

GHALY, A. E.; Dave, D.; Brooks, M. S.; Budge, S. Production of Biodiesel by Enzymatic Transesterification: Review. **American Journal of Biochemistry and Biotechnology**. vol. 6, p. 54-76, 2010.

GHARAT, N. & RATHOD, V. K. Ultrasound assisted enzyme catalyzed transesterification of waste cooking oil with dimethyl carbonate. **Ultrason Sonochem**. vol. 20, p. 900-5, 2013.

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, p. 168, 2007.

GODOI, Fernanda Condi. **Membrana densa de quitosana contendo nanopartículas de cobre: caracterização e possíveis aplicações**. Tese de Doutorado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química. São Paulo – SP, 2013, 164p.

GOG, A.; Roman, M.; Tos, M.; Paizs, C.; Irimie, F. D. Biodiesel production using enzymatic transesterification - Current state and perspectives. **Renewable Energy**. vol. 39, p. 10 – 16, 2012.

GOMES, F. M.; Pereira, E. B.; Castro, H. F. Immobilization of Lipase on Chitin and Its Use in Nonconventional Biocatalysis. **Biomacromolecules**. vol. 5, p. 17-23, 2004.

GONSALVES, A. A.; Araújo, C. R. M.; Soares, N. A.; Goulart, M. O. F.; Abreu, F. C. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quim. Nova**. vol. 34, n°. 7, p.1215-1223, 2011.

GULDHE, A.; Singh, B.; Mutanda, T.; Permaul, K.; Bux, F. Advances in synthesis of biodiesel via enzyme catalysis: Novel and sustainable approaches. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. vol. 41, p. 1447–1464, 2015.

HÁ, S. H.; Lan, M. N.; Lee, S. H.; Hwang, S. M.; Koo, Y. M. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil in ionic liquids. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 41, p. 480–483, 2007.

HAMA, S. & KONDO, A. Enzymatic biodiesel production: An overview of potential feedstocks and process development. **Bioresource Technology**. vol. 135, p. 386–395, 2013.

HAMA, S.; Tamalampudi, S.; Yoshida, A.; Tamadani, N.; Kuratani, N.; Noda, H.; Fukuda, H.; Kondo, A. Enzymatic packed-bed reactor integrated with glycerol separating system for solvent-free production of biodiesel fuel. **Biochemical Engineering Journal**. vol. 55, p. 66–71, 2011.

HAMA, S.; Yamaji, H.; Fukumizu, T.; Numatab, T.; Tamalampudi, S.; Kondo, A.; Nodac, H.; Fukuda, H. Biodiesel-fuel production in a packed-bed reactor using lipase-producing *Rhizopus oryzae* cells immobilized within biomass support particles. **Biochemical Engineering Journal**. vol. 34, p. 273–278, 2007.

HAMA, S.; Yoshida, A.; Tamadani, N.; Noda, H.; Kondo, A. Enzymatic production of biodiesel from waste cooking oil in a packed-bed reactor: An engineering approach to separation of hydrophilic impurities. **Bioresource Technology**. vol. 135, p. 417–421, 2013b.

HERMANN, P.S.P.; Silva, M.A.P.; Bernardes, R.; Job, A.E.; Colnago, L.A.; Frommer, J.E.; Mattoso, L.H.C. Microscopia de varredura por força: uma ferramenta poderosa no estudo de polímeros. **Polímeros: ciência e tecnologia**. 1997.

HERMANSYAH, H.; Arbianti, R.; Prameshwari, D. A. Non-Alcohol Route of Biodiesel Synthesis from Used Cooking Oil Using Immobilized Biocatalyst in Packed Bed Reactor. ***Journal of Sustainable Energy & Environment***. Vol. 2, p. 1-5, 2011.

HERNANDEZ, K.; Galan, C. G.; Lafuente, R. F. Simple and eficiente immobilization of lipase B from *Candida antarctica* on porous styrene–divinylbenzene beads. ***Enzyme and Microbial Technology***. vol. 49, p. 72–78, 2011.

HONG, Y.; Gao, C.; Xie, Y.; Gong, Y.; Shen, J. Collagen-coated polylactide microspheres as chondrocyte microcarriers. ***Biomaterials***. vol. 26, p. 6305–6313, 2005.

HUANG, D.; Han, S.; Han, Z.; Lin, Y. Biodiesel production catalyzed by *Rhizomucor miehei* lipase-displaying *Pichia pastoris* whole cells in na isooctane system. ***Biochemical Engineering Journal***. vol. 63, p. 10 – 14, 2012.

HUNG, T. C.; Giridhar, R.; Chiou, S. H.; Wu, W. T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***. vol. 26, p. 69–78, 2003.

HUNG, T.C.; Giridhar, R.; Chiou, S.H.; Wu, W.T. Binary immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***. vol. 26, p. 69–78, 2003.

ISGROVE, F. H.; Williams, R. J. H.; Niven, G. W.; Andrews, A. T. Enzyme immobilization on nylon– optimization and the steps used to prevent enzyme leakage from the support. ***Enzyme and Microbial Technology*** vol. 28, p. 225–232, 2001.

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***. vol. 8, 2001.

JAEGER, K. E. & EGGERT, T. Lipases for biotechnology. ***Curr. Opin. Biotech***, vol.13, p. 390 – 397. 2002.

JANG, M. G.; Kimb, D. K.; Parkb, S. C.; Leeb, J. S.; Kima, S. W. Biodiesel production from crude canola oil by two-step enzymatic processes. ***Renewable Energy***. vol. 42, p. 99-104, 2012.

JUNIOR, I. I.; Miranda, L. S. M.; Souza, R. O. M. A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions: Review. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. vols. 85– 86, p. 1– 9, 2013.

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***. vol. 91, n°. 1, p. 12-15. 2001.

KAIEDA, M.; Samukawa, T.; Matsumoto, T.; Ban, K.; Kondo, A.; Shimida, Y.; Noda, H.; Nomoto, F.; Ohtsuka, K.; Izumoto, E.; Fukuda, H. Biodiesel Fuel Production from Plant Oil Catalyzed by *Rhizopus oryzae* Lipase in a Water-Containing System without an organic solvent. ***Journal of Bioscience and Bioengineerwng***. vol. 88, n°. 6, p. 627-631, 1999.

KASAAI, Mohammad R. A review of several reported procedures to determine the degree of *N*-acetylation for chitin and chitosan using infrared spectroscopy. ***Carbohydrate Polymers***, Vol. 71, p. 497–508, 2008.

KATIYAR, M. & ALI, A. Immobilization of *Candida rugosa* Lipase on MCM-41 for the Transesterification of Cotton Seed Oil. ***Journal of Oleo Science***. vol. 61, p. 469-475, 2012.

KODA, R.; Numata, T.; Hama, S.; Tamalampudi, S.; Nakashima, K.; Tanaka, T.; Kondo, A. Ethanolysis of repressed oil to produce biodiesel fuel catalyzed by *Fusarium heterosporum* lipase-expressing fungus immobilized whole-cell biocatalysts. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***. vol. 66, p. 101 – 104, 2010.

KUMAR, M. M.; Reddy, J. R. C.; Rao, B. V. S. K.; Prasad, R. B. N. Lipase-mediated conversion of vegetable oils into biodiesel using ethyl acetate as acyl acceptor. ***Bioresource Technology***. vol. 98 p.1260–1264, 2007.

KUO, C. H.; Peng, L. T.; Kan, S. C.; Liu, Y. C.; Shieh, C. J. Lipase-immobilized biocatalytic membranes for biodiesel production. **Bioresource Technology**. vol. 145, p. 229–232, 2013.

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 Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, Vol. 87, p. 2538– 2545, 2012.

LAO, L.; Tan, H.; Wang, Y.; Gao, C. Chitosan modified poly(l-lactide) microspheres as cell microcarriers for cartilage tissue engineering. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, vol. 66, p. 218–225, 2008.

LARA, P. V. & PARK, E. Y. Potential application of waste activated bleaching earth on the production of fatty acid alkyl esters using *Candida cylindracea* lipase in organic solvent system. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 34, p. 270–277, 2004.

LARANJEIRA, M. C. M. & FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Quim. Nova**, vol. 32, n°. 3, p. 672-678, 2009.

LAUS, R.; Laranjeira, M. C. M.; Martins, A. O.; Fávere, V. T. Microesferas de quitosana reticuladas com tripolifosfato utilizados para remoção da acidez, ferro (III) e manganês (II) de águas contaminadas pela mineração de carvão. **Quim. Nova**. vol. 29, n°1, p. 34-39, 2006.

LECA, M.; Tcacenco, L.; Micutz, M.; Staicu, T. Optimization of biodiesel production by transesterification of vegetable oils using lipases. **Romanian Biotechnological Letters**. vol. 15, n°.5, 2010.

LECETA, I.; Guerrero, P.; Ibarburu, I.; Dueñas, M.T.; Caba, K. Characterization and antimicrobial analysis of chitosan-based films. **Journal of Food Engineering**. Vol.116, p. 889–899, 2013.

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, p. 123, 2009.

LEITE, Melina Vasconcelos. **Microcápsulas de alginato-quitosana contendo nanopartículas magnéticas para liberação controlada de progesterona.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual do Norte Fluminense – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2014, 104p.

LEUNG, D. Y.C.; Wu, X.; Leung, M. K. H. A review on biodiesel production using catalyzed transesterification. **Applied Energy.** vol. 87, p. 1083–1095, 2010.

LI, G., Jiang, Y., Huang, K., Ding, P., Chen, J. Preparation and properties of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds,** Vol. 466, p. 451-456, 2008.

LI, L.; Du, W.; Liu, D.; Wang, L.; Li, Z. Lipase-catalyzed transesterification of rapeseed oils for biodiesel production with a novel organic solvent as the reaction médium. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic.** vol. 43, p. 58–62, 2006.

LI, N. W.; Zong, M. H.; Wua, H. Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized lipase from *Penicillium expansum*. **Process Biochemistry.** vol. 44, p. 685–688, 2009.

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

LI, S.; Hu, J.; Liu, B. Use of chemically modified PMMA microspheresn for enzyme immobilization. **BioSystems** vol. 77, p. 25–32, 2004.

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, p. 252, 2009b.

LI, Z.; Deng, L.; Lu, J.; Guo, X.; Yang, Z.; Tan, T. Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Methyl Esters from Crude Rice Bran Oil with Immobilized *Candida sp.* 99-125. **Chinese Journal of Chemical Engineering.** vol. 18, n°5, p. 870-875, 2010.

LIMA, I. S.; Ribeiro, E. S.; Airoidi, C. O emprego de quitosana quimicamente modificada com anidrido succínico na adsorção de azul de metileno. **Quim. Nova.** vol. 29, n°. 3, p. 501-506, 2006.

LIU, Q.; Hua, Y.; Kong, X.; Zhang, C.; Chen, Y. Covalent immobilization of hydroperoxide lyase on chitosan hybrid hydrogels and production of C6 aldehydes by immobilized enzyme. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***. vol. 95 p. 89– 98, 2013.

LIU, T., Wang, Z.L., Zhao, L., Yang, X. ***Chemical Engineering Journal***, 2012, 196-202.

LIU, Y.; Jia, S.; Wu, Q.; Ran, J.; Zhang, W.; Wu, S. Studies of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles prepared by co-precipitation under the magnetic field for lipase immobilization. ***Catalysis Communications***. vol. 12, p. 717–720, 2011.

LONG, J., Li, X., Wu, Z., Xu, E., Xu, X., Jin, Z., Jiao, A. Immobilization of pullulanase onto activated magneticchitosan/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles prepared by in situ mineralizationand effect of surface functional groups on the stability. ***Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects***, Vol. 472, p. 69–77, 2015.

LONG, Judson hwang wong shyh. ***Synthesis and characterisation of chitosan form shrimp shells***. Universiti Tunku Abdul Rahman, Malaysia- Asia, 2013. 125p.

LÓPEZ, F. A.; Merc, A. L. R.; Alguacil, F. J.; Delgado, A.L. A kinetic study on the thermal behaviour of chitosan. ***Journal of Thermal Analysis and Calorimetry***, Vol. 91, n. 2, p. 633–639, 2008.

LORENTE, G. F.; Cabrera, Z.; Godoy, C.; Lafuente, R. F.; Palomo, J. M.; Guisan, J. M. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. ***Process Biochemistry***. vol. 43, p. 1061–1067, 2008.

LORENTE, G. F.; Palomo, J. M.; Cabrera, Z.; Guisán, J. M.; Lafuente, R. F. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. ***Enzyme and Microbial Technology***. vol. 41 p. 565–569, 2007.

LU, J.; Nie, K.; Xie, F.; Wang, F.; Tan, T. Enzymatic synthesis of fatty acid methyl esters from lard with immobilized *Candida sp.* 99-125. **Process Biochemistry**. vol. 42, p. 1367–1370, 2007.

LUCAS, E. F., Soares, B. G., Monteiro, E. Caracterização de polímeros: determinação de peso molecular e análise térmica, Rio de Janeiro – RJ: **E papers**, 366p. 2001.

MACEIRAS, R.; Vega, M.; Costa, C.; Ramos, P.; Márquez, M. C. Effect of methanol content on enzymatic production of biodiesel from waste frying oil. **Fuel**. vol. 88, p. 2130–2134, 2009.

MACHADO, A. B. **Preparação e Caracterização de lípases imobilizadas para utilização em biocatálise**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba – PR, 2008. 154p.

MANOEL, E. A.; Santos, J. C. S.; Freire, D. M. G.; Rueda, N.; Lafuente, R. F. Immobilization of lipases on hydrophobic supports involves the openform of the enzyme. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 71, p. 53–57, 2015.

MARTINS, Paolla Carminatti. **Quitosana como catalisador na transesterificação do óleo de soja para produção de biodiesel**. Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília – UMB. Brasília – DF, 2008, 63p.

MARUM, D. S. **Biocatalisadores magnéticos a partir de quitosana**. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2013, 107p.

MARUM, D.S., Monteiro, L.S., Tavares, M.I.B., Rodriguez, R.J.S. Modificação química da quitosana, na utilização de um suporte polimérico. **Anais do 14º Congresso Brasileiro de Polímeros** – Águas de Lindóia, SP, p. 3459-3463, 2017.

MEDINA, A. R.; Moreno, P. A. G.; Cerdán, L. E.; Grima, E. M. Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. **Biotechnology Advances**. vol. 27, p. 398–408, 2009.

MENDES, A. A., Castro, H. F., Oiveira, P. C., Giordano, R. L. C. A aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n.5, p. 831-840, 2011.

MENG, X.; Chen, G.; Wang, Y. Biodiesel production from waste cooking oil via alkali catalyst and its engine test. **Fuel Processing Technology**. vol. 89, p. 851 – 857, 2008.

MIYAKAWA, W.; Otani, C. Aplicações de microscopia de força atômica. **Ativ. P&D IEAv**. Vol 1, p. 121. São José dos Campos – SP, 2008.

MONTEIRO, L.S., Marum, D.S., Ridríguez, R.J.S. Síntese e caracterização de nanomagnetita e formulação de suportes com propriedades magnéticas. **Anais do 14º Congresso Brasileiro de Polímeros** – Águas de Lindóia, SP, p. 975-979, 2017.

MOUYA, V.K. & IMAMDAR N. N. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive & Functional Polymers**. vol. 68, p. 1013–1051, 2008.

NARANJO, J. C.; Córdoba, A.; Giraldo, L.; García, V. S.; Piraján, J. C. M. Lipase supported on granular activated carbon and activated carbon cloth as a catalyst in the synthesis of biodiesel fuel. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 66, p. 166–171, 2010.

NASSREDDINE, S.; Karout, A.; Christ, M. L.; Pierre, A. C. Transesterification of a vegetal oil with methanol catalyzed by a silica fibre reinforced aerogel encapsulated lipase. **Applied Catalysis A: General**. vol. 344, p. 70–77, 2008.

NGO, T.P.N., Zhang, W., Wang, W., Li, Z. Reversible clustering og magnetic nanobiocatalysts for high-performance biocatalysis and easy catalyst recycling. **Chem. Commun**. Vol. 48, 4584-7. 2012.

NIE, K.; Xie, F.; Wang, F.; Tan, T. Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 43, p. 142–147, 2006.

NOUREDDINI, H.; Gao, X.; Philkana, R. S. Immobilized *Pseudomonas cepacia* lipase for biodiesel fuel production from soybean oil. **Bioresource Technology**. vol. 96, p. 769–777, 2005.

OGAWA, K.; Yui, T.; Okuyama, k. Three D structures of chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**. vol. 34, p. 1–8, 2004.

OLARU, A.M.; Marin, L.; Morariu, S.; Pricope, G.; Pinteala, M.; Mititelu, L.T. Biocompatible chitosan based hydrogels for potential application in local tumour therapy. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 179, p. 59–70, 2018.

OLIVEIRA, D. & OLIVEIRA, J. V. Enzymatic alcoholysis of palm kernel oil in n-hexane and SCCO<sub>2</sub>. **Journal of Supercritical Fluids**. vol. 19, p. 141–148, 2001.

OLIVEIRA, I. R. W. Z. & VIEIRA, I. C. Construção e aplicação de biossensores usando diferentes procedimentos de imobilização da peroxidase de vegetal em matriz de quitosana. **Quim. Nova**, vol. 29, n° 5, p. 932-939, 2006.

OLIVEIRA, V.C.S.P., Tavares, M.I.B., Silva, E.M.B., Lima, B.N.B., Neto, R.P.C. Uso da RMN de baixa resolução na avaliação da dinâmica molecular do *Origanum vulgare*. **Quim. Nova**, Vol. 38, No. 3, p. 351-355, 2015.

OMAR, W. N. N. W. & AMIN, N. A. S. Biodiesel production from waste cooking oil over alkaline modified zirconia catalyst. **Fuel Processing Technology**. vol. 92, p. 2397–2405, 2011.

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

PALOMO, J. M.; Ortiz, C.; Lorente, G. F.; Fuentes, M.; Guisán, J. M.; Lafuente, R. F. Lipase–lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 36, p. 447–454, 2005.

PAN, C.; Hu, B.; Li, W.; Sun, Y.; Ye, H.; Zeng, X. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of  $\beta$ -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 61, p. 208–215, 2009.

PASTOR, C.; González, L.S.; Chiralt, A.; Cháfer, M.; Martínez, C.G. Physical and antioxidant properties of chitosan and methylcellulose based films containing resveratrol. **Food Hydrocolloids**. Vol. 30, p. 272-280, 2013.

PENG, G.; Zhao, C.; Liu, B.; Ye, F.; Jianga, H. Immobilized trypsin onto chitosan modified monodisperse microspheres: A different way for improving carrier's surface biocompatibility. **Applied Surface Science**. vol. 258, p. 5543– 5552, 2012.

PENG, Y.; Ping, H. Z.; Juan, X. Y.; Cheng, H. P.; Jun, T. J. Effect of support surface chemistry on lipase adsorption and activity. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 94, p. 69– 76, 2013.

PESSOA, F. L. P.; Magalhães, S. P.; Falcão, P. W. C. Production of Biodiesel via Enzymatic Ethanolysis of the Sunflower and Soybean Oils: Modeling. **Appl Biochem Biotechnol**. vol. 161, p. 238–244, 2010.

PIRAJA, J. C. M. & GIRALDO, L. Study of immobilized candida rugosa lipase for biodiesel fuel production from palm oil by flow microcalorimetry. **Arabian Journal of Chemistry**. vol. 4, p. 55–62, 2011.

POPPE, J. K.; Costa, A. P. O.; Brasil, M. C.; Rodrigues, R. C.; Ayub, M. A. Z. Multipoint covalent immobilization of lipases on aldehyde-activated support: Characterization and application in transesterification reaction. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 94, p. 57– 62, 2013.

POPPE, J. K.; Lafuente, R. F.; Rodrigues, R. C.; Ayu, M. A. Z. Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: Present status and future prospects. **Biotechnology Advances**. vol. 33, p. 511–525, 2015.

PRABAHARAN, M., & MANO, J. F. Stimuli-responsive hydrogels based on polysaccharides incorporated with thermo-responsive polymers as novel biomaterials. **Macromolecular Bioscience**, 6(12), 991–1, 2006.

QIAO, Y.; Chen, S.; Liu, Y.; Sun, H.; Jia, S.; Shi, J.; Pedersen, C.M.; Wang, Y.; Hou, X. Pyrolysis of chitin biomass: TG–MS analysis and solid char residue Characterization. **Carbohydrate Polymers** vol. 133, p. 163–170, 2015.

RANGEL, Maria Lucia da Silva Santos. **Nanomagnetitas revestidas com biopolímero quitosana para aplicação na remediação ambiental**. Centro Universitário Estadual da Zona Oeste, Rio de Janeiro, 2012. 47p.

RANJBAKHASHA, E.; Bordbar, A. K.; Abbasi, M.; Khosropour, A. R.; Shams, E. Enhancement of stability and catalytic activity of immobilized lipase on silica-coated modified magnetite nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**. vol. 179, p. 272–276, 2012.

REINAS, A.E.; Hoscheid, J.; Outuki, P.M.; Cardoso, M.L.C. Preparation and characterization of microcapsules of *Pterodon pubescens* Benth. by using natural polymers. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 50, n. 4, 2014.

RINAUDO, Marguerite. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Prog. Polym. Sci.** vol. 31, p. 603–632, 2006.

RINAUDO, Marguerite. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**. vol. 57, p. 397–430 2008.

ROCHA, Caroline Oliveira Da. **Nanopartículas magnéticas como suporte para imobilização de lipases**. Dissertação (Mestrado), Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho, Araraquara- SP, 2016. 57p.

RODRIGUES, D. S.; Mendesa, A. A.; Adriano, W. S.; Gonçalves, L. R. B.; Giordano, R. L. C. Multipoint covalent immobilization of microbial lipase on chitosan and agarose activated by different methods. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 51, p. 100–109, 2008.

RODRIGUES, Rafael Costa. **Síntese de biodiesel através de transesterificação enzimática de óleos vegetais catalisadas por lipase imobilizada por ligação covalente multipontual**. Tese (Doutorado). Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre – RS. 183p. 2009.

ROMAN, D.C.C, Pérez, V.H., Castro, H.F., Orrego, C.E., Giraldo, O.H. Silveira, E.G., Davida, G.F. Ethyl esters (biodiesel) production by *Pseudomonas fluorescens* lipase immobilized on chitosan with magnetic properties in a bioreactor assisted by electromagnetic field. **Fuel**, Vol. 196, p. 481-487, 2017.

ROMÁN, Diana Catalina Cubides. **Produção de biodiesel por método não convencional em biorreator assistido por campo eletromagnético**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF. Campos dos Goytacazes – RJ, 2015, 139p.

ROYON, D.; Daz, M.; Ellenrieder, G.; Locatelli, S. Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent. **Bioresource Technology**. vol. 98, p. 648–653, 2007.

SAKAI, S.; Yuping Liu, Y.; Yamaguchi, T.; Watanabe, R.; Kawabe, M.; Kawakami, K. Production of butyl-biodiesel using lipase physically-adsorbed onto electrospun polyacrylonitrile fibers. **Bioresource Technology**, 101, 7344–7349, 2010.

SALIS, A.; Bhattacharyya, M. S.; Monduzzi, M.; Solinas, V. Role of the support surface on the loading and the activity of *Pseudomonas fluorescens* lipase used for biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 57, p. 262–269, 2009.

SALIS, A.; Pinna, M.; Monduzzi, M.; Solinas, V. Comparison among immobilised lipases on macroporous polypropylene toward biodiesel synthesis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 54, p. 19–26, 2008.

SANCHEZ-SILVA, L.; López-González, D.; Villaseñor, J.; Sánchez, P.; Valverde, J.L. Thermogravimetric–mass spectrometric analysis of lignocellulosic and marine biomass pyrolysis. **Bioresource Technology** vol. 109, p. 163–172, 2012.

SANTANA, S. D. F.; Pina, A. S.; Roque, A. C. A. Immobilization of enterokinase on magnetic supports for the cleavage of fusion proteins. **Journal of Biotechnology**. vol. 161, p. 378– 382, 2012.

SANTOS, Carla Alexandra Nunes de Sousa. **Propriedades de Filmes de Quitosano – Influência do grau de acetilação e da massa molecular do biopolímero**. Dissertação (Mestrado) Universidade de Aveiro – Aveiro, Portugal. 2006. 133p.

SCHEFFEL, D. L. S. **Citotoxicidade Transdentinária e Efeito da Carbodiimida (EDC) na Biomodificação do Colágeno Dentinário e na Degradação da Interface Adesiva**. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista – UNESP. Araraquara – SP, 2013, 163p.

SELLIN, N., **Análise da superfície de polímeros pós – tratamento corona**. Tese (Doutorado). Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas – SP. 78p. 2002.

SHAH, S. & GUPTA, M. N. Lipase catalyzed preparation of biodiesel from *Jatropha* oil in a solvent free system. **Process Biochemistry**. vol. 42, p. 409–414, 2007.

SHAH, S.; Sharma, S.; Gupta, M. N. Enzymatic transesterification for biodiesel production. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. vol. 40, p. 392-399, 2003.

SHAO, P.; Meng, X.; He, J.; Sun, P. Analysis of immobilized *Candida rugosa* lipase catalyzed preparation of biodiesel from rapeseed soapstock. **Food and Bioproducts Processing**. vol. 86, p. 283–289, 2008.

SHIEH, C. J.; Liao, H. F.; Lee, C. C. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. **Bioresource Technology**. vol. 88, p. 103–106, 2003.

SHIMADA, Y.; Watanabe, Y.; Sugihara, A.; Tominaga, Y. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**. vol. 17, p. 133 – 142, 2002.

SHUKLA, S. K.; Mishra, A. K.; Arotiba, O. A.; Mamba, B. B. Chitosan-based nanomaterials: A state-of-the-art review. **International Journal of Biological Macromolecules**. vol. 59, p. 46– 58, 2013.

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, J. A. **Preparação de biocatalisadores utilizando lipase de *Candida antarctica* tipo B imobilizada para a síntese de ésteres de vitamina A**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará – UFC. 97p. Fortaleza, 2007.

SILVA, M. V. C.; Bento, H. B. S.; Oliveira, P. C.; Castro, H. F.; FREITAS, L. Caracterização das propriedades da lipase de *Pseudomonas fluorescens* imobilizada em matriz polimérica híbrida magnetizada. **XXI Congresso Brasileiro de Engenharia Química** – 25 a 29 de setembro. Fortaleza, CE. 2016.

SILVA, R.C., Junior, M.A.S.A., Cestari, A.R. Adsorção de Cr (VI) em esferas reticuladas de quitosana – novas correlações cinéticas e termodinâmicas utilizando microcalorimetria isoérmica contínua. **Química Nova**, vol. 33, n. 4, p. 880 – 884, 2010.

SIMÕES, Tiago Filipe da Silva. **Síntese enzimática de lípidos estruturados sucedâneos de gordura de leite humano, enriquecidos em ácidos gordos polinsaturados**. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar/Instituto Politécnico de Leiria-IPL. Peniche – Portugal, 2011. 97p.

SINI, T. K., Santhosh, S., Mathew, P. T. Study of the production of chitin and chitosan from shrimp shell by *Bacillus subtilis* fermentation. **Carbohydrate Research**, Vol. 342, p. 2423–2429, 2007.

SOARES, C.M.F., De Castro, H.F., De Moraes, F.F., Zanin, G.M. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on Controlled Pore Silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, Vol. 77–79, p. 745-757, 1999.

SOARES, Geicilene Katrine de Paiva. **Estudo estrutural e morfológico de membranas de quitosana e de N,O-carboximetilquitosana**. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Amazonas- UFA, Manaus – AM. 2015. 97p.

SOUMANOU, M. M. & BORNSCHEUER, U. T. Improvement in lipase-catalyzed synthesis of fatty acid methyl esters from sunflower oil. **Enzyme Microb. Technol.** vol. 33, p. 97 – 103, 2003.

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.

SRIMNHAN, P.; Kongnum, K.; Taweerodjanakarn, S.; Hongpattarakere, T. Selection of lipase producing yeasts for methanol-tolerant biocatalyst as whole cell application for palm-oil transesterification. **Enzyme and Microbial Technology**. vol. 48, p. 293–298, 2011.

STAMATIALIS, D. F.; Dias, C. R.; Pinho, M. N. Atomic force microscopy on dense and asymmetric membranes. *Journal of Membrane Science*. vol. 160, p. 235 – 242, 1999.

STAROSZCZYK, H., Sztuka, K., Wolska, J., Paja, A.W., Kołodziejska, I. Interactions of fish gelatin and chitosan in uncrosslinked and crosslinked with EDC films: FT-IR study. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, Vol. 117, p. 707–712, 2014.

SUM, T.; Du, W.; Zeng, J.; Dai, L.; Liu, D. Exploring the effects of oil inducer on whole cell-mediated methanolysis for biodiesel production. **Process Biochemistry**. vol. 45, p. 514–518, 2010.

TALUKDER, M. R.; Das, P.; Fang, T. S.; Wu, J. C. Enhanced enzymatic transesterification of palm oil to biodiesel. **Biochemical Engineering Journal**. vol. 55, p. 119–122, 2011.

TAMALAMPUDI, S.; Talukder, M. R.; Hamad, S.; Numatab, T.; Kondo, A.; Fukuda, H. Enzymatic production of biodiesel from *Jatropha* oil: A comparative study of immobilized-whole cell and commercial lipases as a biocatalyst. **Biochemical Engineering Journal**. vol. 39, p. 185–189, 2008.

TAN, T.; Lu, J.; Nie, K.; Deng, L.; Wang, F. Biodiesel production with immobilized lipase: A review. **Biotechnology Advances**. vol. 28, p. 628–634, 2010.

TIMKOVICH, R. Detection of the Stable Addition of Carbodiimide to Proteins. **Analytical Biochemistry**. vol. 79, p. 135 – 143, 1977.

TINTOR, Cleiton Barcot. **Utilização de resíduos gordurosos para a produção de biodiesel via enzimática**. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Alfenas - Poços de Caldas, MG. 2014. 86p.

TONELI, J. T. C. L., Murr, F. E. X., Park, K. J. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, vol.7, n°.2, p.181-204, 2005.

TORRES, M. A.; Vieira, R. S.; Beppu, M. M.; Santana, C. C. Produção e Caracterização de Microesferas de Quitosana Modificadas Quimicamente. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol. 15, n° 4, p. 306-312, 2005.

TURKAN, A. & KALAY, S. Monitoring lipase-catalyzed methanolysis of sunflower oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Elucidation of the mechanisms of lipases. **Journal of Chromatography A**. vol. 1127, p. 34–44, 2006.

TUZMEN, N.; Akdogan, F.; Kalburcu, T.; Akgol, S.; Denizli, A. Development of the magnetic beads for dye ligand affinity chromatography and application to magnetically stabilized fluidized bed system. **Process Biochem.**, Vol. 45, p. 556-562. 2010.

VIEIRA, E.F.S.; Cestaria, A.R.; Chagas, R.A.; Gracy Karla da R. Cortes, G.K.R. Obtenção e caracterização de matriz apropriada para sistemas de liberação prolongada—estudos de liberação dos herbicidas atrazina e diuron. **Quim. Nova**, Vol. 37, No. 3, p. 398-403, 2014.

VLNIESKA, Vitor. **Polímeros sulfonados como catalisadores heterogêneos na produção de biodiesel de óleos e gorduras ácidas**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná. Curitiba – PR. 2013.

WANG, L.; Du, W.; Liu, D.; Li, L.; Dai, N. Lipase-catalyzed biodiesel production from soybean oil deodorizer distillate with absorbent present in tert-butanol system. **J. Mol. Catal.** vol. 43, p. 29 – 32, 2006.

WANG, T., Turhan, M., Gunasekaran, S. Selected properties of pH- sensitive, biodegradable chitosan–poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polym. Int.** Vol. 53, p. 911–918, 2004.

WANG, X. H.; Lia, D. P.; Wanga, W. J.; Fenga, Q. L.; Cuia, F. Z.; Xub, Y. X.; Songb, X. H.; Mark van der Werf. Crosslinked collagen/chitosan matrix for artificial livers. ***Biomaterials***. vol. 24, p. 3213–3220, 2003.

WANG, Y.; Shen, X.; Li, Z.; Li, X.; Wang, F.; Nie, X.; Jeng, J. immobilized recombinant *Rhizopus oryzae* lipase for the production of biodiesel in solvent free system. ***Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic***. vol. 67, p. 45 – 51, 2010.

WU, J.; Liao, C.; Zhang, J.; Cheng, W.; Zhou, N.; Wang, S.; Wan, Y. Incorporation of protein-loaded microspheres into chitosan-polycaprolactone scaffolds for controlled release. ***Carbohydrate Polymers***. vol. 86, p. 1048– 1054, 2011.

WU, T.; Wu, C.; Fang, Z.; Ma, X.; Chen, S.; Hu, Y. Effect of chitosan microcapsules loaded with nisin on the preservation of small yellow croaker. ***Food Control***. Vol. 79, p. 317-324, 2017.

WU, Y.; Wang, Y.; Luo, G.; Dai, Y. In situ preparation of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles for lipase immobilization by cross-linking and oxidation in aqueous solution. ***Bioresource Technology***. vol. 100, p. 3459–3464, 2009.

XIE, W. & MA, N. Enzymatic transesterification of soybean oil by using immobilized lipase on magnetic nano-particles. ***Biomass and Bioenergy***. vol. 34, p. 890 – 896, 2010.

XIE, W. & WANG, J. Immobilized lipase on magnetic chitosan microspheres for transesterification of soybean oil. ***Biomass and Bioenergy***. vol. 36, p. 373 – 380, 2012.

YAAKOB, Z.; Mohammad, M.; Alherbawi, M.; Alam, Z.; Sopian, K. Overview of the production of biodiesel from Waste cooking oil. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***. vol. 18, p. 184–193, 2013.

YAGIZ, F.; Kazan, D.; Akin, A. N. Biodiesel production from waste oils by using lipase immobilized on hydrotalcite and zeolites. ***Chemical Engineering Journal***. vol. 134, p. 262–267, 2007.

YE, T.; Chang-ren, Z.; Qing-hui, Z.; Ju-lin, Y.; Feng-xian, H.; Jin-huan, T. Enhanced cell affinity of poly(L-lactide) film by immobilizing phosphonized chitosan. ***Applied Surface Science***, vol. 255, p. 446–448, 2008.

YONG, Y.; Bai, Y. X.; Li, Y. F.; Lin, L.; Cui, Y. J.; Xia, C. G. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. ***Process Biochemistry***. vol. 43, p. 1179–1185, 2008.

YÜCEL, Y. Biodiesel production from pomace oil by using lipase immobilized onto olive pomace. ***Bioresource Technology***. vol. 102, p. 3977-3980, 2011.

ZENG, H. Y.; Liao, K. B.; Deng, X.; Jiang, H.; Zhang, F. Characterization of the lipase immobilized on Mg–Al hydrotalcite for biodiesel: Review. ***Process Biochemistry***. vol. 44, p. 791–798, 2009.

ZENG, L.; Qin, C.; Wang, L.; Li, W. Volatile compounds formed from the pyrolysis of chitosan. ***Carbohydrate Polymers***. Vol. 83, p. 1553–1557, 2011.

ZHANG, D. H.; Yuwen, L. X.; Peng, L. J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. ***Journal of Chemistry***. 2013.

ZHANG, D. H.; Yuwen, L. X.; Xie, Y. L.; Li, W.; Li, X. B. Improving immobilization of lipase onto magnetic microspheres with moderate hydrophobicity /hydrophilicity. ***Colloids and Surfaces B: Biointerfaces***. vol. 89, p. 73– 78, 2012.

ZHANG, Y.; Xue, C.; Li, Z.; Zhang, Y.; Fu, X. Preparation of half deacetylated chitosan by forced penetration and its properties. ***Carbohydrate Polymers***. Vol. 65, p. 229–234, 2006.

ZHAO, X.; Qi, F.; Yuan, C.; Du, W.; Liu, D. Lipase-catalyzed process for biodiesel production: Enzyme immobilization, process simulation and optimization. ***Renewable and Sustainable Energy Reviews***. vol. 44, p. 182–197, 2015.

ZHOU, G. X.; Chen, G. Y.; Yan, B. B. Biodiesel production in a magnetically-stabilized, fluidized bed reactor with an immobilized lipase in magnetic chitosan microspheres. ***Biotechnol Lett***. vol. 36, p. 63–68, 2014.