



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

Bruno Niero

**Síntese de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com aminoácidos  
visando a imobilização de enzimas**

FLORIANÓPOLIS

2019

Bruno Niero

**Síntese de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com aminoácidos  
visando a imobilização de enzimas**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Química  
Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.

Florianópolis

2019

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

Niero, Bruno

Síntese de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com aminoácidos visando a imobilização de enzimas / Bruno Niero ; orientador, Agenor Furigo Jr., 2017.

67 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Nanopartículas. 3. Magnetita. 4. Aminoácidos. 5. Lipases. I. Furigo Jr., Agenor. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Química. III. Título.



Bruno Niero

**Síntese de nanopartículas magnéticas funcionalizadas com aminoácidos  
visando a imobilização de enzimas**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. José Miguel Müller  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Rosana Oliveira Henriques  
Universidade Federal de Santa Catarina

Dra. Rozineide Aparecida Antunes Boca Santa  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Química.

---

Prof. Dra. Cíntia Soares  
Coordenadora do Programa

---

Prof. Dr. Agenor Furigo Jr.  
Orientador

Florianópolis, 31 de maio de 2017.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de classe e aos meus queridos pais.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Agnaldo e Márcia, por acreditarem na minha capacidade e potencial.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Agenor Furigo Jr., por todos os conhecimentos compartilhados, conselhos e paciência na orientação desta dissertação.

A todos os amigos e colegas do Laboratório de Engenharia Bioquímica (ENGEBIO), em especial a Denise Estevez Mortiz, Rosana Oliveira Henriques, Jonathan Alexander Bork, Ana Júlia Souza de Oliveira e Martha Luisa Moecke, pelos momentos de aprendizado e auxílios prestados na elaboração deste trabalho.

A todas as equipes da Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, do Laboratório de Física (LFFS) e a Central de Análises do Departamento de Química pela realização de diversas análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química e a Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

## RESUMO

O interesse em técnicas de imobilização de enzimas em vários tipos de suporte tem crescido devido às várias vantagens oferecidas por esta metodologia frente à utilização de enzimas livres; a principal delas é o custo operacional. Nanopartículas magnéticas (NPM) funcionalizadas vêm mostrando um grande potencial de aplicação devido à facilidade de recuperação do catalisador do meio reacional. Neste estudo, nanopartículas de magnetita foram modificadas com aminoácidos em um processo por duas etapas. Inicialmente, foi realizada a reação de precipitação da magnetita em meio alcalino com a presença de ânions de oxalato. Após, seguiu-se com a substituição do oxalato por um aminoácido (Arginina, Leucina, Cisteína, Histidina, Tirosina). As partículas sintetizadas foram caracterizadas por técnicas de espectroscopia de infravermelho, difração de raios X, potencial zeta, magnetometria de amostra vibrante e pelo teor de aminoácidos consumidos por meio do método da ninidrina. As NPM funcionalizadas com aminoácidos foram, então, adotadas como suporte para a imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* TLL. A caracterização do suporte revelou que as partículas de magnetita são puras e com um tamanho médio de 8 nm. O controle das condições reacionais mostrou ser de extrema importância, principalmente em relação ao pH e à desoxigenação do meio. O ânion oxalato adicionado durante a primeira etapa do processo auxiliou na estabilização do material e na modificação com aminoácidos durante a segunda etapa do processo. A análise de magnetização mostrou que o suporte conservou uma alta capacidade paramagnética e a análise de infravermelho mostrou os grupos químicos presentes no suporte antes da imobilização, comprovando a substituição do oxalato pelos aminoácidos utilizados. O potencial zeta das partículas mostrou uma alta estabilidade do material. A imobilização da lipase TLL atingiu um rendimento de imobilização de 74% no suporte de Histidina, quando previamente ativada com glutaraldeído.

**Palavras-chave:** Nanopartículas. Magnetita. Aminoácidos. Lipases.

## ABSTRACT

Techniques using immobilization of enzymes in various types of support have increased the interest due the various advantages provided by immobilized enzymes against the use of free enzymes, mainly by the decrease of the operational cost. Functionalized magnetic nanoparticles have show great application potentials in processes because the facility of catalyst recovery from the reactional medium. In this study, magnetic nanoparticles (MNP) modified with aminoacids have been synthesized by a two step process. First the precipitation of MNP modified with oxalate in a alkaline medium, followed by the substitution of the oxalate by one of the amino acids (Argenine, Leucine, Cysteine, Histidine or Tyrosine). Then the synthethised MNP was characterized by X-Ray Diffraction, Fourier Transform infrared spectroscopy, magnetization of vibrating sample, determination of zeta potential and aminoacid absorption by ninhydrin method. MNP particles with aminoacids were then adopted as support and lipase from *Thermomyces lanuginosus* (TLL) was imobbilized. Characterization revealed that the support has particles of pure magnetite, with a particle size of 8 nm, the control of pH, temperature, deoxygenation and the ammount of oxalate on the reactional medium it's vital to achieve this. Magnetometry analysis show that the matterial has good paramagnetic capacity, infrared analysis show that the oxalate was changed by amino acids on the second step and the zeta potential revealed a very stable particle. The immobilization of the lipase achieved a 74% final hydrolisis activity when previously activated with glutaraldehyde.

**Keywords:** Nanoparticles. Magnetite. Amino acids. Lipases.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura geral de um aminoácido .....	18
Figura 2 - Ligação peptídica entre dois aminoácidos .....	19
Figura 3 - Reação da ninidrina .....	20
Figura 4 - Energias de ativação em reações com e sem catalisadores .....	21
Figura 5 - Diferentes reações catalisadas por lipases .....	22
Figura 6 - Representação tridimensional da estrutura cristalina da lipase <i>Thermomyces lanuginosa</i> com a tampa (vermelho) fechada ou aberta revelando o seu sítio ativo (verde) e uma região flexível composta por aminoácidos (azul).....	24
Figura 7 - Métodos de imobilização de enzimas .....	25
Figura 8 - Imobilização em suporte ativado com glutaraldeído .....	27
Figura 9 - Ciclo de histerese de um material magnético .....	30
Figura 10 - Curva de histerese de um material superparamagnético.....	30
Figura 11 - Mecanismo proposto para a segunda etapa do processo de síntese .....	44
Figura 12 - Concentração do aminoácido Leucina no sobrenadante ao longo da segunda etapa da síntese com razão molar $Fe_3O_4:Leu = 5:1$ , 75 °C e pH 5,0.....	45
Figura 13 - Difratoograma de raios-X para a magnetita pura (NPM) e modificadas (NPM-Ox) ou o aminoácido Histidina (NPM-AA).....	47
Figura 14 - Espectro de FTIR das partículas de NPM-Ox, Arg, Cys, His, Leu e Tyr ..	48
Figura 15 - Potencial zeta em função do pH pra as amostras de NPM, NPM-Ox e NPM-AA .....	50
Figura 16 - Curvas de magnetização das partículas de NPM, NPM-Ox e NPM-AA..	52
Figura 17 - Espectro de FTIR do efeito do pH do meio durante a segunda etapa do processo de síntese .....	53
Figura 18 - Espectro de FTIR do efeito do ânion oxalato na ligação dos aminoácidos à superfície da magnetita .....	55
Figura 19 - Rendimento de imobilização da TLL nos suportes modificados com Arginina, Cisteína, Histidina, Leucina e Tirosina utilizando 1,3 mg de proteína para cada 1 g de suporte em temperatura ambiente e sem ativação com glutaraldeído ..	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação e pI dos aminoácidos .....	18
Tabela 2 - Publicações utilizando partículas de magnetita como suporte para imobilização de enzimas .....	33
Tabela 3 - Concentração de aminoácido Leucina no sobrenadante durante a segunda etapa de reação.....	46
Tabela 4 - Valores de magnetização das nanopartículas magnéticas .....	52
Tabela 5 - Variações no processo de síntese .....	54

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTS – 3-aminopropiltrietoxisilano

Arg – arginina

Cys – cisteína

DRX – difratometria de raio-x

$E_{at}$  – energia de ativação em processo sem catalisador

$E_{cat}$  – energia de ativação em processo com catalisador

$E_p$  – energia dos produtos

$E_r$  – energia dos reagentes

FTIR – espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier

H – campo magnético

$H_c$  – campo coercivo

$H_p$  – entalpia dos produtos

$H_r$  – entalpia dos reagentes

$\Delta H$  – diferença de entalpia

His – histidina

Leu – leucina

M – magnetização

$M_r$  – magnetização remanente

$M_s$  – magnetização de saturação

MAV – magnetização de amostra vibrante

NPM – nanopartículas de magnetita

NPM-Ox – nanopartículas de magnetita funcionalizadas com oxalato

NPM-AA – nanopartículas de magnetita funcionalizadas com aminoácidos

pI – ponto isoelétrico

PLL – porcina pancreática

$p$ NP –  $p$ -nitrofenol

$p$ NPB – butirato de  $p$ -nitrofenila

Tyr – tirosina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>17</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>18</b>
3.1	AMINOÁCIDOS .....	18
<b>3.1.1</b>	<b>Reação da Ninidrina</b> .....	<b>20</b>
3.2	ENZIMAS .....	20
<b>3.2.1</b>	<b>Lipases</b> .....	<b>22</b>
3.3	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	24
<b>3.3.1</b>	<b>Métodos de Imobilização de Enzimas</b> .....	<b>25</b>
3.4	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO .....	27
<b>3.4.1</b>	<b>Propriedades Magnéticas</b> .....	<b>28</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Síntese de Nanopartículas de Ferro</b> .....	<b>31</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Método de co-precipitação</b> .....	<b>31</b>
3.5	IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	32
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>37</b>
4.1	MATERIAIS .....	37
4.2	MÉTODOS.....	37
<b>4.2.1</b>	<b>Síntese das nanopartículas de magnetita</b> .....	<b>37</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Determinação do teor de aminoácidos</b> .....	<b>38</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Determinação da estrutura e morfologia</b> .....	<b>39</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Determinação da composição química</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.5</b>	<b>Determinação das propriedades magnéticas</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.6</b>	<b>Determinação do potencial zeta</b> .....	<b>40</b>
<b>4.2.7</b>	<b>Ativação do suporte com Glutaraldeído</b> .....	<b>41</b>

<b>4.2.8</b>	<b>Imobilização da Lipase.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.9</b>	<b>Determinação das proteínas totais .....</b>	<b>41</b>
<b>4.2.10</b>	<b>Determinação da atividade hidrolítica .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
5.1	Síntese do compósito de nanopartículas magnéticas e aminoácido (NPM-AA) .....	43
5.2	Estrutura química e tamanho do compósito NPM-AA.....	46
5.3	Estabilidade coloidal .....	50
5.4	Propriedades magnéticas .....	51
5.5	Efeitos do pH durante a segunda etapa do processo sobre o teor de aminoácidos ligados a superfície da nanopartícula magnética .....	53
5.6	Influência do ânion oxalato no processo de síntese da nanopartícula magnética.....	54
5.7	Imobilização da Lipase TLL no suporte de NPM-AA .....	56
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Atividades envolvendo a utilização de nanopartículas magnéticas têm atraído a atenção de diversas áreas nos últimos anos. Na medicina, este tipo de material já é utilizado como agente de contraste em ressonância magnética e para a liberação controlada de fármacos no corpo. Aplicações biológicas deste material incluem um futuro promissor, sendo estudado para utilização em separação de células, purificação de proteínas, RNA e DNA (TIE et al., 2006) e também em processos catalíticos (CIPOLATTI et al., 2014).

A utilização de catalisadores pela indústria química é um objeto de estudo há muitos anos no ramo da engenharia. A utilização de enzimas como catalisadores possui uma série de vantagens frente aos catalisadores convencionais, devido à sua capacidade de catalisar reações em condições brandas de temperatura, pH e pressão, além de possuir uma alta seletividade (SHULER; KARGI, 2002; CAO et al., 2012).

Em contrapartida, o grande problema de processos catalisados por enzimas é o alto custo do catalisador, sendo que, muitas vezes, para o uso de enzimas em processos industriais ser viável, é necessária a utilização de técnicas de imobilização (VILLENEUVE et al., 2000). Este processo permite que o biocatalisador fique mais estável e resistente, podendo atuar em uma maior variedade de pHs e temperaturas, além de ser capaz de ser reutilizada por vários ciclos. (MATEO et al., 2007).

Os suportes utilizados variam muito de acordo com o tipo de aplicação, tendo cada um suas características específicas, que atende aos requisitos necessários dependendo do tipo de imobilização desejada. Estes suportes podem ser desde um derivado de um óxido metálico ou não metálico ou até mesmo um polímero sintetizado. A utilização de um suporte com características magnéticas apresenta a vantagem de conseguir ser facilmente retirado do meio reacional, conseguindo capturar o catalisador disperso apenas pela aplicação de um campo magnético.

Enzimas podem ser imobilizadas a estas nanopartículas magnéticas através de ligações covalentes ou interações iônicas. Contudo, os óxidos de ferro que compõe a magnetita não possuem afinidade para imobilizar a enzima em sua superfície, para que isto aconteça é necessário que ocorra a funcionalização deste material. (CAO et al., 2012).

Aminoácidos são ligantes químicos muito utilizados como agentes de ligação em partículas magnéticas. Por serem blocos fundamentais na construção de peptídeos e proteínas, suas aplicações na indústria bioquímica, farmacêutica e agroquímica é vasta. Entender a interação destes elementos com o suporte pode auxiliar na criação de um composto estável e eficiente, que pode ser utilizado na imobilização de enzimas. Dentro deste contexto, este trabalho apresenta um estudo sobre as interações de alguns aminoácidos na síntese e funcionalização de nanopartículas de magnetita com o intuito de promover um suporte capaz de realizar a imobilização de enzimas por ligação covalente ou adsorção física.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo sintetizar nanocompósitos magnéticos estáveis de magnetita e aminoácidos visando a sua utilização na imobilização de enzimas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Identificar as principais variáveis que influenciam na formação do nanocompósitos magnetita-oxalato;

Verificar a importância da utilização do ânion oxalato para a síntese dos nanocompósitos pretendidos;

Avaliar a influência do pH no processo de substituição do ânion oxalato por aminoácidos;

Obter os nanocompósitos magnéticos para os aminoácidos Arginina, Cisteína, Histidina, Leucina e Tirosina;

Avaliar a ligação dos aminoácidos na nanopartícula de magnetita;

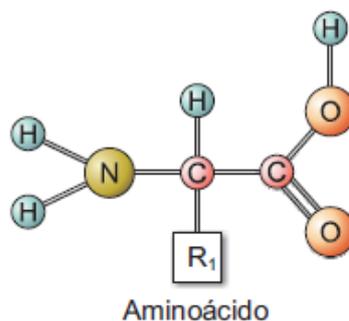
Estudar o processo de síntese com aminoácidos (tempo de reação, pH do meio, concentração de aminoácido);

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 AMINOÁCIDOS

Aminoácidos são as moléculas que contêm um grupo amina e outro grupo carboxila, normalmente ligados a um carbono  $\alpha$  que está ligado a um grupo R (figura 1), esta cadeia lateral R é o que diferencia um tipo de aminoácido do outro, podendo este ser classificado de acordo com a polaridade e o grupamento funcional presente no grupo R.

Figura 1 - Estrutura geral de um aminoácido



Fonte: SOUZA, 2013

Existem 20 aminoácidos principais que são sintetizados por seres vivos, o corpo humano consegue produzir 11, com os outros 9 sendo conseguidos pela ingestão de alimentos. Uma propriedade importante dos aminoácidos é o seu ponto isoelétrico (pI). Neste ponto as cargas positivas e negativas são equivalentes, sendo que abaixo deste valor a molécula apresenta uma carga positiva, enquanto valores acima do pI apresentam uma carga negativa. A tabela 1 mostra quais são os grupamentos R dos aminoácidos, as propriedades que estas cadeias laterais dão a molécula e o ponto isoelétrico de cada molécula.

Tabela 1 - Classificação e pI dos aminoácidos

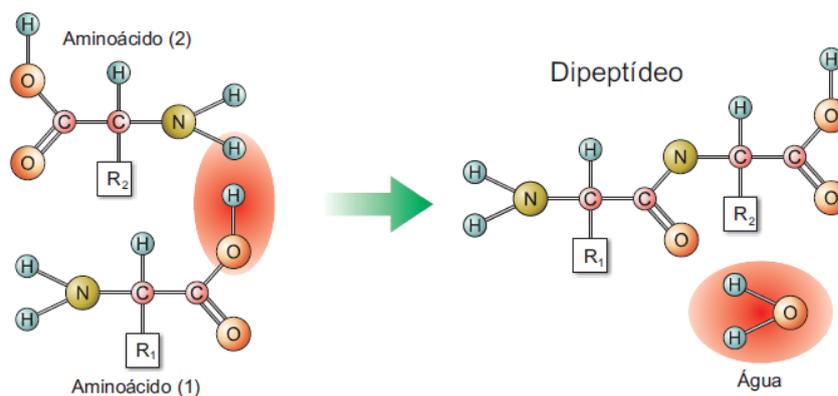
Aminoácido	Sigla	Cadeia Lateral	Classificação	pI
Glicina	Gly	H	Sem cadeia lateral	5,97
Alanina	Ala	CH <sub>3</sub>	Apolar	6,01
Valina	Val	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	Apolar	5,97
Leucina	Leu	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Apolar	5,98
Isoleucina	Ile	C <sub>4</sub> H <sub>9</sub>	Apolar	6,02

Prolina	Pro	$C_3H_6$	Apolar	6,48
Fenilalanina	Phe	$CH_2C_6H_5$	Apolar, aromático	5,48
Triptofano	Trp	$C_9H_8N$	Apolar, aromático	5,89
Tirosina	Tyr	$CH_2C_6H_4OH$	Polar, aromático	5,66
Serina	Ser	$CH_2OH$	Polar, não carregado	5,68
Treonina	Thr	$CHOHCH_3$	Polar, não carregado	5,87
Cisteína	Cys	$CH_2SH$	Polar, grupo tiol	5,07
Metionina	Met	$C_3H_7S$	Polar, não carregado	5,74
Asparagina	Asn	$CH_2CONH_2$	Polar, não carregado	5,41
Glutamina	Gln	$C_2H_4CONH_2$	Polar, não carregado	5,65
Ácido Aspártico	Asp	$CH_2COO^-$	Polar, carregado negativamente	2,77
Ácido Glutâmico	Glu	$C_2H_4COO^-$	Polar, carregado negativamente	3,22
Lisina	Lys	$C_4H_8NH_3$	Polar, carregado positivamente	9,74
Arginina	Arg	$C_3H_6NHCN_2H_6^+$	Polar, carregado positivamente	10,76
Histidina	His	$C_4H_5N_2$	Polar, grupo imidazol	7,59

Fonte: Elaborado pelo Autor

Aminoácidos podem realizar ligações entre o grupo carboxílico de uma molécula com o grupo amina de outro aminoácido, formando uma ligação C-N e liberando água (Figura 2), este tipo de ligação é conhecida como ligação peptídica. As proteínas são um conjunto de aminoácidos ligados através de ligações peptídicas na ordem das centenas ou milhares de ligações, sendo as unidades que se repetem denominadas resíduos de aminoácidos.

Figura 2 - Ligação peptídica entre dois aminoácidos



Fonte: SOUZA, 2013

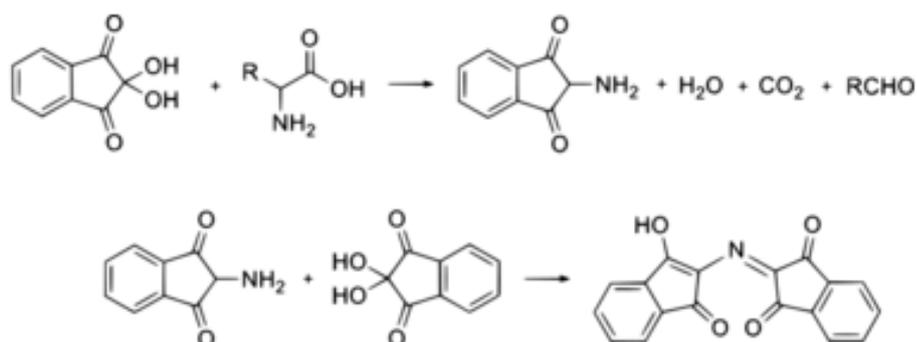
Os aminoácidos podem reagir de muitas maneiras com suas funções amina, carboxila e os diversos grupamentos R. A reação com ninidrina é uma destas, e o seu processo será explanado mais detalhadamente no item a seguir.

### 3.1.1 Reação da Ninidrina

A metodologia da ninidrina foi introduzida para determinação quantitativa de aminoácidos, sendo inicialmente desenvolvida para a análise dos aminoácidos pela cromatografia (MOORE; STEIN, 1948, 1954). O método foi sendo adaptado para a determinação de compostos aminados em produtos alimentícios e farmacêuticos com uma metodologia rápida em seu preparo e aplicação e sem necessidade de equipamentos de alto valor.

A ninidrina reage com todos os aminoácidos primários gerando um composto conhecido como púrpura de Ruhemann (Figura 3), que pode ser medido em uma absorção de comprimento de onda de 570 nm. Por reagir com o carbono  $\alpha$ , em aminoácidos secundários, como no caso da prolina, a reação de redução origina um produto diferente, de cor amarela, com leitura em 440 nm.

Figura 3 - Reação da ninidrina



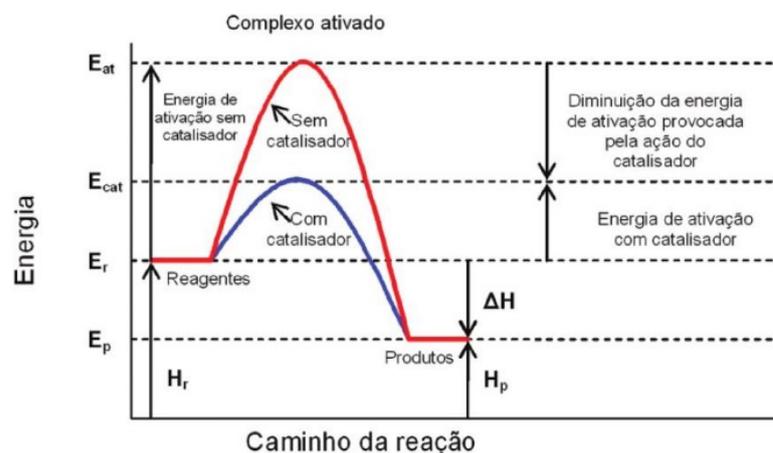
Fonte: Elaborado pelo Autor

## 3.2 ENZIMAS

Enzimas são uma importante classe de proteínas com uma elevada massa molecular e responsáveis por aumentar a velocidade da reação química de várias reações biológicas, diminuindo sua energia de ativação (Figura 4). Estes catalisadores biológicos têm vantagens frente aos catalisadores inorgânicos devido

ao seu alto grau de especificidade e velocidades de reações muito maiores em condições brandas de pH e temperatura (SHULER; KARGI, 2002; FOGLER, 2012).

Figura 4 - Energias de ativação em reações com e sem catalisadores



Fonte: Elaborado pelo Autor

Enquanto algumas enzimas têm uma cadeia apenas com ligações polipeptídicas entre seus aminoácidos, outras apresentam um grupo não proteico para serem ativas. Este grupo pode ser tanto um cofator (como íons metálicos de Fe, Mg, Zn) ou uma coenzima (como moléculas de FAD, NAD, vitaminas) (SHULER; KARGI, 2002).

Fatores externos podem influenciar no desempenho da enzima, podendo desde diminuir seu rendimento ou até mesmo sua total inativação como catalisador da reação. Entre os mais importantes podemos destacar o pH e a temperatura.

O pH pode variar a atividade devido a certas enzimas apresentarem grupos iônicos em seus sítios ativos, uma mudança de pH pode alterar a forma iônica destes sítios e também pode afetar na estrutura tridimensional da molécula, cada tipo de enzima apresenta um pH ótimo de atuação.

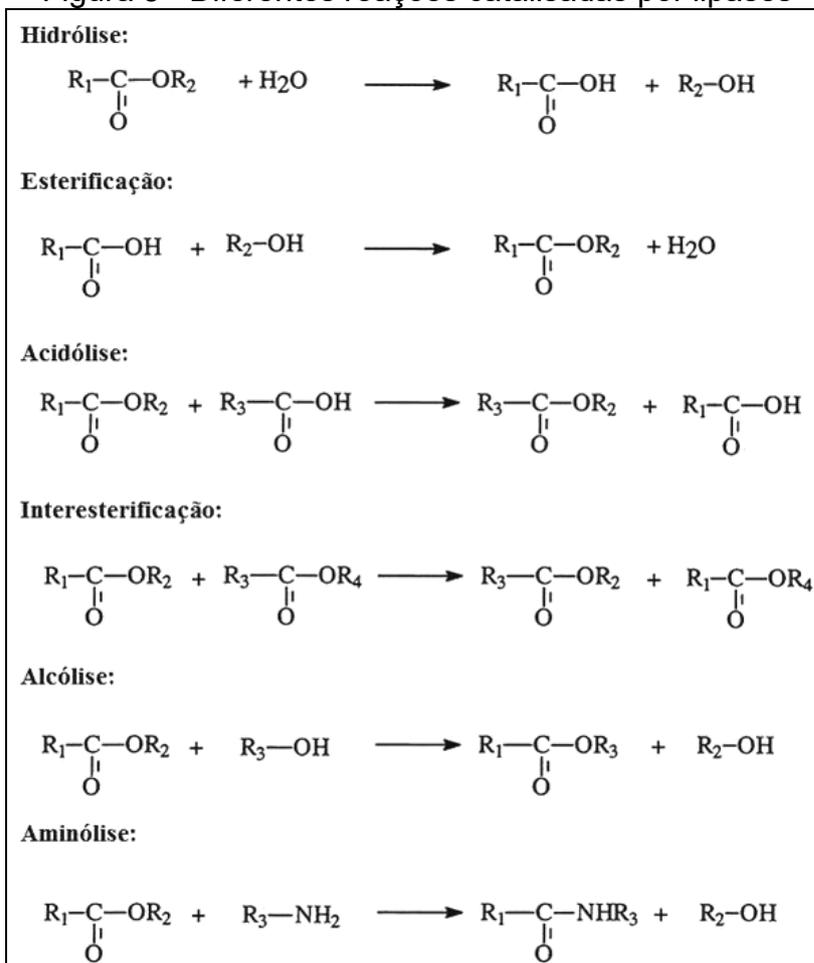
A velocidade de uma reação catalisada por uma enzima sobe conforme o aumento da temperatura, contudo, existe uma temperatura limite, diferente para cada tipo de enzima, em que após atingida leva a desnaturação da proteína, inativando permanentemente a enzima. Outro tipo comum de inativação é por um

composto inibidor, podendo ocorrer até mesmo pelo excesso de substrato presente na reação.

### 3.2.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases) são uma classe de enzimas que tem como função biológica catalisar as reações de hidrólise das ligações éster presentes em triacilgliceróis. São enzimas comumente encontradas na natureza, podendo ser obtidas a partir de fontes animais, vegetais e microbianas, que, devido à facilidade de produção em larga escala é a origem da maioria das lipases utilizadas comercialmente. Também são capazes de catalisar reações reversas a hidrólise, como a esterificação, transesterificação (aciólise, interesterificação, alcoólise) e aminólise (Figura 5).

Figura 5 - Diferentes reações catalisadas por lipases



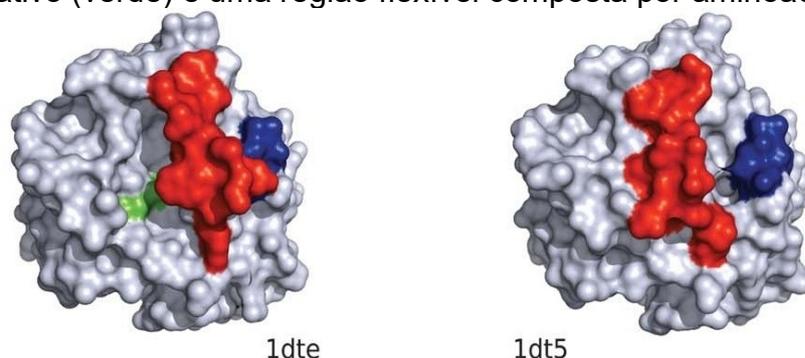
As razões do enorme potencial de utilização das lipases microbianas ainda incluem os fatos de não ter a necessidade de um co-fator, serem estáveis em solventes orgânicos, atuar em faixas grandes de pH e apresentar uma alta especificidade, regiosseletividade, quimiosseletividade e enantiosseletividade (JAEGER; REETZ, 1998; TORRES et. al.,2006; MATEO, 2007).

A maioria das lipases tem seu sítio catalítico formado por uma tríade catalítica, constituída pelos resíduos dos aminoácidos serina, histidina e aspartato, onde ocorre a conversão do substrato. O sítio catalítico é ainda protegido por uma estrutura móvel que atua como uma espécie de tampa (ou *lid*) (BORNSCHEURER, 2002), em algumas enzimas esta tampa é praticamente inexistente, enquanto em outras são maiores e mais volumosas, podendo apresentar uma dupla tampa (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

Por terem como substrato natural óleos e gorduras a tampa presente nas lipases tem como função proteger o sítio ativo quando está exposta em ambiente hidrofílico, com o sítio ativo isolado a enzima se encontra em uma conformação inativa. Quando em ambiente hidrofóbico, a tampa se abre, dando acesso ao sítio ativo e expondo uma região hidrofóbica, este mecanismo é essencial para o funcionamento das lipases e é conhecido como ativação interfacial (BRZOZOWSKI et. al., 2000; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010, FERNANDEZ-LORENTE et. al., 2006).

A Figura 6 mostra a representação tridimensional da estrutura cristalina da lipase de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) obtida a partir do Protein Data Bank (PDB) (ID codes 1dte e 1dt5) com o seu sítio ativo composto por Ser146, His258 e Asp201 (região verde) nas duas conformações, onde a região vermelha indica a tampa e a azul uma zona flexível (REHM; TRODLER; PLEISS, 2010).

Figura 6 - Representação tridimensional da estrutura cristalina da lipase *Thermomyces lanuginosa* com a tampa (vermelho) fechada ou aberta revelando o seu sítio ativo (verde) e uma região flexível composta por aminoácidos (azul)



Fonte: RHEM; TRODLER; PLEISS, 2010

### 3.3 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

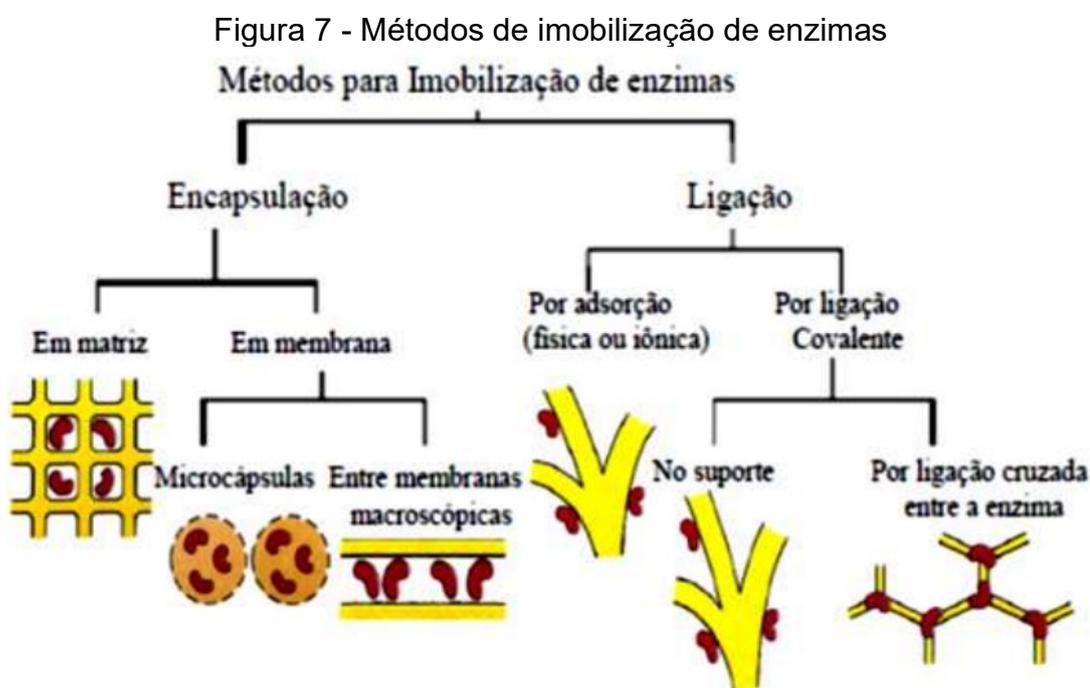
Apesar das inúmeras vantagens dos biocatalisadores em frente aos catalisadores convencionais, como a elevada eficiência e alto grau de especificidade, a utilização de enzimas livres em processos industriais apresenta alguns problemas. O primeiro é a inativação das enzimas ao longo do tempo, que quando isoladas de seu ambiente natural, ficam sensíveis às condições do processo e a substâncias inibidoras, podendo até mesmo uma alta concentração de seu substrato atuar na sua inibição, o segundo é devido ao elevado custo de produção e purificação, sendo complicada a recuperação das enzimas livres do meio reacional. Para contornar tais desvantagens, se recorre a processos de imobilização, que equivale ao aprisionamento das enzimas em uma matriz de confinamento ou suporte sólido.

A principal razão para se imobilizar enzimas está na capacidade de isolar o catalisador do produto da reação, promovendo uma fácil separação e uma consequente reutilização, visando aumentar a produtividade da enzima (RODRIGUES et. al., 2010). A imobilização pode ainda conferir uma maior estabilidade às variações de pH, temperatura e atuação de inibidores, mas o fator mais importante para se obter uma boa exploração do catalisador está na capacidade de reuso, pois reflete a uma alta produtividade catalítica, conseguindo produzir uma maior quantidade de produto com uma mesma quantidade de catalisador, diminuindo o custo final.

Existe uma grande gama de processos de imobilização, contudo, não existe uma metodologia universal para todos os tipos de enzimas, sendo que o ideal é aquele que produz um derivado que retém boa parte da atividade da enzima livre após o processo de imobilização por um processo simples e de baixo custo (DALLA-VECCHIA et. al., 2004). Os principais métodos para imobilização estão descritos no tópico a seguir.

### 3.3.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

Os métodos existentes (Figura 7) podem ser classificados como métodos físicos, onde a enzima fica retida no interior de um suporte, ou métodos com interação química, onde ocorre uma ligação química entre o suporte e a enzima. A retenção física pode se dar pelo encapsulamento em matrizes, em microcápsulas de polímeros ou entre membranas macroscópicas, enquanto as ligações podem ser por forças iônicas, Van der Waals, pontes de hidrogênio ou como ligações covalentes entre a enzima e o suporte.



Fonte: DALLA-VECCHIA et. al., 2004

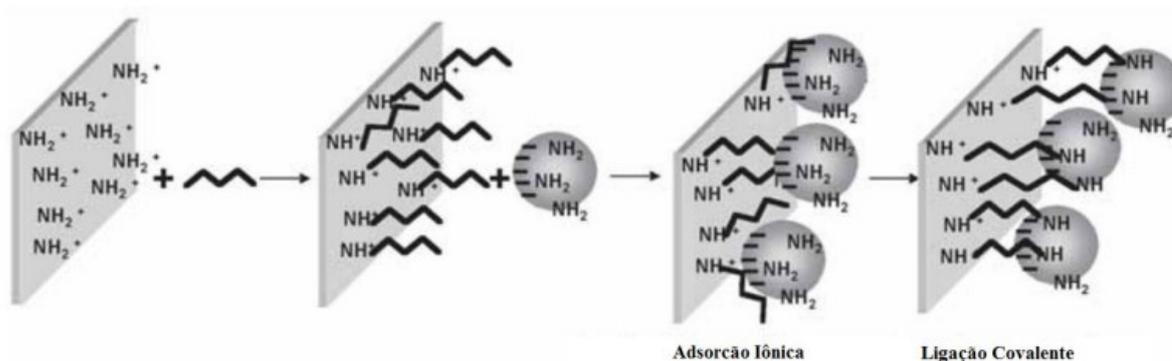
Na imobilização por encapsulação, a enzima fica retida no interior de um suporte, que pode ser uma matriz porosa ou encapsulada por uma membrana semipermeável, formando microcápsulas. Assim, as proteínas não conseguem passar para fora ou dentro da cápsula formada, contudo pequenas partículas, como as de substratos, circulam livremente através da membrana, conseguindo chegar até o sítio ativo das enzimas. Este método não apresenta uma grande deformação na estrutura da enzima, pois o catalisador e a parte polimérica não interagem entre si, assim o rendimento da atividade das enzimas imobilizadas pode ser comparado ao da enzima livre (VILLENEUVE et. al. 2000; DALLA-VECHIA et. al., 2004).

O método por adsorção física é considerado o mais simples e ocorre através de interações de van der Waals, interações hidrofóbicas ou ligações iônicas entre a enzima e o suporte. É considerado um método de baixo custo e de fácil execução, sendo que normalmente não necessita de um tratamento prévio da enzima. Outra vantagem é que no caso de inativação da enzima, pode ser feita uma dessorção e nova imobilização, aproveitando o mesmo suporte, contudo, este mesmo fator é a principal desvantagem do método, pois pode ocorrer uma dessorção das enzimas devido a variações do meio reacional, como pH, temperatura, agitação e interações entre as moléculas adsorvidas. Na imobilização por adsorção o sítio ativo da enzima não sofre alterações, podendo até em certas ocasiões, ocorrer uma abertura da tampa (*lid*), imobilizando a enzima na sua conformação aberta, fazendo com que a atividade enzimática consiga ser até mesmo maior que na enzima livre (DALLA-VECHIA et. al., 2004; PALOMO et. al., 2005; FERNANDEZ-LORENTE et. al., 2007; PALLA et. al., 2011).

A imobilização por ligação covalente ocorre pela ligação entre resíduos de aminoácidos presentes na enzima, fora do seu sítio catalítico, e grupos reativos presentes na superfície do suporte. Tais resíduos de aminoácidos podem ser tantos grupos carboxílicos, hidroxilas, sulfidrilas e amino. Preferencialmente, os grupos amino são os mais utilizados neste tipo de imobilização, devido a serem altamente ativos, mesmo antes de algum tratamento na enzima, assim, por serem grupamentos nucleofílicos, o suporte tem de ser normalmente ativado com reagentes específicos, para tornarem seus grupos funcionais eletrofílicos, e reagirem fortemente com os grupos amino presentes na enzima.

Outra metodologia utilizada em métodos de ligação covalente é a da utilização de um agente ativador, como glutaraldeído ou carbodiimida, em suportes contendo aminas primárias em sua superfície (Figura 8), servindo com um espaçador entre a enzima e o suporte. Estes agentes podem também servir para outro tipo de ligação covalente, formando ligações cruzadas entre os grupos amino das enzimas, podendo ocorrer sem a presença de um suporte, formando agregados enzimáticos insolúveis (SHELDON, 2007).

Figura 8 - Imobilização em suporte ativado com glutaraldeído



Fonte: GUIBAN, 2006

Devido a ligação covalente, neste tipo de imobilização a enzima fica fixada ao suporte, podendo ser utilizada tanto em meios hidrofóbicos quanto em hidrofílicos, sem sofrer a dessorção de catalisador. A formação de múltiplas ligações ainda diminui a flexibilidade, gerando um derivado mais estável frente a variações de pH, temperatura e a presença de inibidores. Entretanto, a alta força da ligação pode promover uma modificação química e estrutural da enzima, acarretando perdas de atividade (CAO, 2005).

### 3.4 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS DE FERRO

Um nanomaterial é uma substância química, podendo ser natural ou sintetizada, que contém partículas soltas ou agregadas em um aglomerado e onde mais de 50% destas partículas apresentam em sua dimensão externa um tamanho entre 1 e 100 nm (Definition of a *nanomaterial*, European Commission; WILLARD,

2004). Nestas dimensões, os materiais podem apresentar alterações em suas propriedades físicas e químicas quando comparados as substâncias macrométricas (*bulk*).

Os óxidos de ferro podem aparecer com variadas composições, oferecendo diferentes propriedades magnéticas. Podem ter estrutura cúbica ou hexagonal e sua fórmula molecular é do tipo  $M.Fe_2O_3$ , onde M é um metal no estado de oxidação +2, podendo ser Mn, Co, Ni, Cu ou Fe. Dentre estes óxidos, as formas mais utilizadas são a da magnetita ( $Fe_3O_4$ ), maguemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) e hematita ( $\alpha-Fe_2O_3$ ), sendo a primeira a utilizada neste trabalho.

A magnetita é constituída por íons  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$ , podendo ser escrita como  $FeO.Fe_2O_3$ , apresenta uma estrutura cúbica, onde o cátion  $Fe^{2+}$  ocupam os interstícios octaédricos enquanto os cátions  $Fe^{3+}$  ocupam os interstícios tetraédricos e octaédricos. Seu arranjo cristalino é do tipo espinélio inverso e devido a esta estrutura a magnetita apresenta magnetização espontânea.

Na superfície da magnetita, existem átomos de ferro que não estão ligados aos átomos de oxigênio, atuando como ácidos de Lewis e se coordenando com moléculas que podem doar um par de elétrons. Quando em meio aquoso, estes átomos de ferro se coordenam com as moléculas de água, que se dissociam e deixam a partícula de magnetita envolta por grupos hidroxila, onde podem ser utilizados para a ligação de compostos funcionais e tem como função dar maior estabilidade ao material, necessário para a obtenção de um material estável contra a agregação quando expostos a um campo magnético (GUPTA, 2005; EDERMOGLU, 2006).

### 3.4.1 Propriedades Magnéticas

O fenômeno de atração e repulsão de certas substâncias frente a um campo magnético externo é devido ao movimento de elétrons em torno do núcleo, que gera um momento magnético ou dipolo magnético. A existência deste momento é explicada pelo movimento dos elétrons em torno do núcleo, pelo momento angular orbital e o movimento do elétron em torno do próprio eixo (*spin*). O *spin* pode ter tanto uma orientação *spin up* ou *spin down*.

O comportamento magnético de um material é classificado de acordo com a resposta que este apresenta quando exposto a um campo magnético, sendo divididos em cinco classes principais, podendo ser diamagnéticos, paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos e ferrimagnéticos.

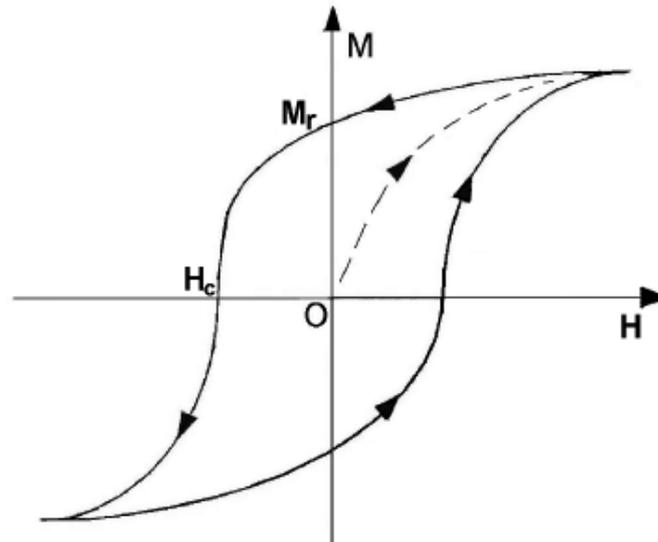
O diamagnetismo é a forma mais fraca de magnetismo, um material diamagnético apresenta todos seus subníveis eletrônicos completos, onde os momentos se cancelam por estarem emparelhados. Quando submetidos a um campo, os momentos de dipolo de um material diamagnético se alinham em sentido contrário ao do campo aplicado, contudo esta interação é muito fraca.

Os outros comportamentos magnéticos são atribuídos a presença de elétrons não emparelhados. Os materiais paramagnéticos possuem momentos magnéticos orientados aleatoriamente, tendo como resultado um momento igual a zero. Ao serem submetidos a um campo magnético ocorre o alinhamento dos dipolos na direção do campo, assim o campo de indução é somado ao campo aplicado, com o campo externo sendo removido, seu momento volta a ser nulo. No ferromagnetismo, o alinhamento de seus momentos de dipolo é permanentemente alinhado em uma direção independente da presença de um campo magnético.

Em materiais antiferromagnéticos os momentos magnéticos estão alinhados em direções opostas, o que leva a uma magnetização nula, ao serem expostos a um campo estes momentos se alinham, o que gera um momento de magnetização maior do que o observado em materiais paramagnéticos. O ferrimagnetismo, por fim, é exibido por matérias que tem momentos magnéticos alinhados como nos materiais ferromagnéticos, com a diferença que neste caso os momentos têm magnitude diferentes, gerando um somatório não nulo e assim, uma magnetização permanente.

O comportamento de um material é analisado através da sua curva de histerese (Figura 9), onde se aplica um campo magnético externo  $H$  a um material inicialmente desmagnetizado, a magnetização aumenta até um valor máximo, conhecido como magnetização de saturação. Diminuindo o valor após se atingir a magnetização de saturação, se obtém um valor residual de magnetização ( $M_r$ ) para um valor de campo aplicado nulo. O campo necessário para atingir um valor de magnetização igual a zero é conhecido como campo coercitivo ( $H_c$ ).

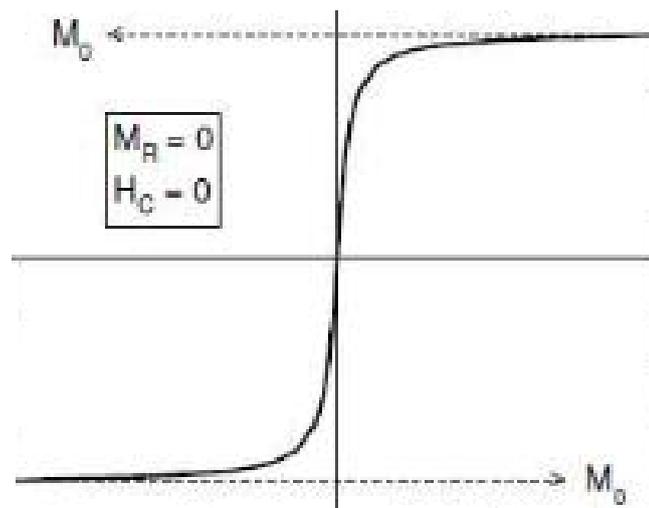
Figura 9 - Ciclo de histerese de um material magnético



Fonte: RIBEIRO, 2000

Nanopartículas magnéticas apresentam uma propriedade chamada superparamagnetismo, onde seus momentos estão alinhados em apenas uma direção, não ocorrendo a histerese, com valores de  $M_r$  e  $H_c$  nulos (Figura 10) (NAGARAJAN, 2008; FARAJI, 2010).

Figura 10 - Curva de histerese de um material superparamagnético



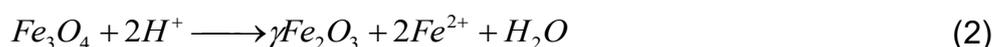
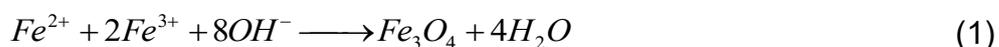
Fonte: ALVES (modificado), 2007

### 3.4.2 Síntese de Nanopartículas de Ferro

Por causa das várias aplicações tecnológicas, a síntese de nanopartículas magnéticas se desenvolveu de forma acentuada nas últimas décadas, partículas com propriedades magnéticas e tamanhos controlados tem sido um desafio para o avanço tecnológico. Graças a isso, vários métodos como sonicação, pirólise, sol-gel, decomposição térmica e muitos outros se apresentaram, contudo o método de co-precipitação ainda é um dos mais difundidos pelo seu baixo custo, simplicidade e alta eficiência na preparação de vários sólidos (GUPTA, 2005; LAURENT et. al., 2008; BARRETO et. al., 2012). Devido à utilização do método de co-precipitação neste trabalho, este método será discutido com maior relevância.

### 3.4.3 Método de co-precipitação

Técnica mais utilizada para a produção tanto de magnetita quanto da maguemita (equações 1 e 2), consiste basicamente na mistura de dois sais de ferro em um meio aquoso e posterior precipitação pela adição de uma base, que atua como agente precipitante, para que o pH seja maior que 8, valores menores não resultam na formação do precipitado sólido. Devido à instabilidade da magnetita e sua sensibilidade a oxidação para maguemita, o processo deve ser conduzido em atmosfera inerte (WILLARD, et. al., 2004; LAURENT, et. al., 2008; FARAJI, et. al., 2010).



O processo de co-precipitação apresenta várias vantagens, como o elevado rendimento, a homogeneidade química, obtenção de partículas finas e uniformes, temperaturas baixas de reação comparada aos outros métodos, tempo pequeno de reação, pouca aglomeração, baixo custo e a sua reprodutibilidade em larga escala.

O tamanho e o formato das partículas de magnetita são extremamente afetados pelas condições de síntese, como o pH, velocidade de agitação, ordem de adição dos reagentes, concentração dos íons e a temperatura do meio reacional. Assim sendo a principal desvantagem deste método é a capacidade de controle da reação, além da necessidade de retirar todo o oxigênio do meio (GUPTA, 2005; LAURENT, et. al., 2008).

### 3.5 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Para utilização das NPM como suportes na imobilização de enzimas é necessária uma modificação da sua estrutura, denominada funcionalização. Como explicado no item 3.4, os átomos de ferro livres presentes na superfície da magnetita agem como base de Lewis e permitem a ligação de grupos funcionais como carboxilas, hidroxilas e aminas, que podem interagir com os resíduos de aminoácidos presentes na enzima realizando a imobilização por adsorção ou ligação covalente.

A funcionalização pode ocorrer pela adição ou pela substituição de um agente ligante a superfície. No primeiro caso, as hidroxilas que estão presentes em meio aquoso permitem a ligação de grupos funcionais, como na utilização de aminopropiltriétoxissilano (APTS), sílica ou surfactantes. No segundo caso ocorre uma substituição dos ligantes por um grupo bifuncional que consegue realizar ligações fortes com a superfície e as enzimas, neste caso o grupo pode ser adicionado durante a síntese das nanopartículas (FARAJI, et. al., 2010).

O primeiro tipo de abordagem é o mais utilizado, contudo o segundo método oferece relevância devido à oportunidade de atingir maior estabilização e funcionalização da partícula durante a síntese do material. Abaixo estão listadas algumas pesquisas, dando destaque ao tipo de suporte, modificação, enzima e método de imobilização utilizados.

A utilização de sílica na funcionalização dos suportes de magnetita é um dos métodos mais utilizados, normalmente além da funcionalização com silanos, o processo requer uma segunda etapa com glutaraldeído servindo com um espaçador entre o suporte e a enzima, além de ser um agente de acoplamento via ligação covalente.

Tabela 2 - Publicações utilizando partículas de magnetita como suporte para imobilização de enzimas

<b>Nanopartícula</b>	<b>Enzima</b>	<b>Tipo de imobilização</b>	<b>Referência</b>
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / PMA – DVB	<i>Candida cylindracea</i>	Covalente	LIU <i>et. al.</i> , 2005
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS – glutaraldeído	<i>Pseudomonas putida</i>	Covalente	SHAW <i>et. al.</i> , 2006
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / P(HEMA-DMDAAC)	<i>Candida rugosa</i>	Adsorção e Covalente	YONG <i>et. al.</i> , 2008
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / sílica + líquido iônico	<i>Candida rugosa</i>	Covalente	JIANG <i>et. al.</i> , 2009
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / SDS	PLL	Adsorção	LEE <i>et. al.</i> , 2009
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / celulose	$\alpha$ -amilase	Covalente	NAMDEO, 2009
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS – glutaraldeído	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Covalente	XIE, 2009
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção e Covalente	ANDRADE <i>et. al.</i> , 2010
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS	<i>Burkholderia cepacia</i>	Adsorção e Covalente	REBELO <i>et. al.</i> , 2010
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / polidopamina	<i>Candida rugosa</i>	Covalente	REN <i>et. al.</i> , 2011
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / sílica – APTS	PLL	Adsorção e Covalente	RANJNAKSH <i>et. al.</i> , 2012
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / gluconato – carbodiimida	<i>Candida antártica</i>	Covalente	SUI <i>et. al.</i> , 2012
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / sílica	<i>Burkholderia sp.</i>	Adsorção	TRAN <i>et. al.</i> , 2012
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS – ácido húmico	<i>Proteína (albumina)</i>	Covalente	BAYRAKCI <i>et. al.</i> , 2014
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Covalente	GHASEMI <i>et. al.</i> , 2014
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / polietilenamina	<i>Aspergillus niger</i>	Covalente	TURODACHE <i>et. al.</i> , 2014
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	<i>Aspergillus niger</i>	Adsorção	HE <i>et. al.</i> , 2015
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS	<i>Thermomyces lanuginosa</i>	Covalente	RAITA <i>et. al.</i> , 2015
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / polidopamina	<i>P. cepacia</i>	Covalente	ANDRADE <i>et. al.</i> , 2016
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / APTS	<i>Aspergillus niger</i>	Covalente	THANGARAJ <i>et. al.</i> , 2016

Fonte: Elaborado pelo Autor

Shaw et. al. (2006) sintetizaram partículas de magnetita e realizaram a funcionalização com APTS, o processo de imobilização se deu pela ativação com glutaraldeído, realizando ligações covalentes entre o suporte e a enzima *Pseudomonas putida*, a caracterização das partículas mostrou um tamanho médio de 11,9 nm. A imobilização reteve 63% da atividade da enzima livre após a imobilização, tendo após 10 ciclos, sendo retido 84% deste valor. O mesmo procedimento foi utilizado por Xie et. al. (2009) na imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosa*, para a produção de biodiesel através da transesterificação do óleo de soja, a atividade retida neste trabalho foi de 70%.

Jiang et. al. (2009) revestiram as nanopartículas com sílica que foram adicionalmente suportadas com líquidos iônicos, a enzima *Candida rugosa* foi imobilizada por ligação covalente. O tamanho das partículas teve diâmetro entre 55 nm e a enzima imobilizada apresentou uma atividade de 118,3% comparada à enzima livre. A enzima imobilizada ainda apresentou uma retenção de 60 % da atividade inicial após 8 ciclos enquanto a livre não apresentava mais nenhuma atividade após 6 ciclos de reação.

Nos trabalhos de Andrade et. al. (2010) e Rebelo et. al. (2010), as partículas foram funcionalizadas com APTS e a imobilização da lipase de *Burkholderia cepacia* foi testada com três diferentes metodologias, via adsorção, entrecruzamento com glutaraldeído ou com carboxibenzaldeído. Os derivados foram aplicados na resolução cinética dos precursores de drogas quirais, (RS)-1-(fenil)etanol e (RS)-2-bromo-1-(fenil) etanol. A metodologia com glutaraldeído foi a que apresentou um melhor resultado, promovendo até oito reutilizações do derivado.

Ranjbaksh et. al. (2012) prepararam as partículas de magnetita por coprecipitação e revestiram com sílica por método sol-gel, a partícula com sílica foi tratada com APTS, a enzima TLL foi então imobilizada com a presença de glutaraldeído como ativador. O derivado apresentou um tamanho médio de 17 nm, o método por imobilização covalente apresentou uma atividade retida de 63,51% após 6 ciclos. Tran et. al. (2012) também utilizaram processo de funcionalização do suporte de magnetita com sílica na síntese de biodiesel em reação de metanólise do azeite de oliva, catalisada pela lipase de *Burkholderia sp.* O derivado enzimático conseguiu ser reutilizado por até 10 vezes, sem perda significativa na sua atividade. A utilização de sílica no revestimento da partícula de magnetita com posterior

funcionalização com APTS e ativação com glutaraldeído também é utilizada por Ghasemi et. al. (2014), Raita et. al. (2015) e Thangaraj et. al. (2016).

A técnica de funcionalização com APTS é utilizada no trabalho de Bayrakci et. al. (2014) na imobilização de ácido húmico para separação e purificação de proteínas de meios aquosos, utilizando a albumina humana como modelo. A extração de proteínas chegou a valores maiores que 90% na maioria dos casos testados, a ligação nas partículas magnéticas facilitou a retirada do suporte do meio.

Outra abordagem muito utilizada é a que utiliza coberturas poliméricas nas nanopartículas, pois garante uma funcionalização além de promover estabilidade e dificuldade de aglomeração, algo característico nas NPM. Diferentes tipos de polímeros podem ser aplicados, como nos trabalhos de Liu et. al. (2005), Yong et. al. (2008) e Ren et. al. (2011).

No trabalho de Liu et. al. (2005), as partículas magnéticas foram recobertas por poli (metacrilato de metila-co-divinilbenzeno), obtidas pela co-polimerização na presença de um fluido magnético, então foi empregada a aminólise para se obter uma quantidade de grupos amino na superfície e então foram aplicadas na imobilização da lipase de *Candida cylindrea*. A vantagem apresentada pelos autores foi a eliminação da etapa de funcionalização, que torna o processo mais viável economicamente.

Yong et. al. (2008), sintetizaram as partículas de magnetita cobertas com ácido oléico que seguiu posterior encapsulamento por copolimerização do glicidil metacrilato, acetato de vinila e dimetacrilato de etilenoglicol. A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada covalentemente no suporte e foram realizados testes de reuso na transesterificação do azeite de oliva, podendo ser utilizado até dez vezes, com atividade de 80% da atividade inicial.

Os estudos realizados por Ren et. al. (2011) e Andrade et. al. (2016) utilizaram a polidopamina no revestimento da NPM. A partícula de magnetita sintetizada foi recoberta com a polidopamina, que permite a formação de ligações covalentes com a enzima devido aos resíduos de aminoácidos presentes no filme polimérico, o primeiro trabalho realizou a imobilização de *Candida rugosa*, e o derivado resultante apresentou uma boa estabilidade em pH extremos e

temperaturas elevadas, sendo utilizado até 21 vezes com uma manutenção de 70% da atividade hidrolítica na hidrólise da triburina. O segundo trabalho imobilizou covalentemente a lipase de *Pseudomonas cepacia* para utilização na produção de biodiesel através da reação de transesterificação do óleo de soja na presença de metanol. A reutilização do derivado sem perda de atividade significativa foi de apenas três vezes segundo os autores. A diferença entre o número de reusos entre os dois trabalhos pode ser explicada pela exposição prolongada ao metanol, que pode afetar a estabilidade da lipase.

O estudo de Namdeo (2005) utiliza uma técnica semelhante às citadas acima por Ren e Andrade. Em seu trabalho, as partículas magnéticas foram revestidas pela coagulação de celulose em meio com sulfato de amônio para modificar algumas das partículas de celulose com grupos amino, onde ocorre a ligação covalente com a  $\alpha$ -amilase. O derivado foi utilizado em posterior estudo de degradação de amido, podendo ser facilmente recuperado do meio reacional para posteriores reutilizações.

No trabalho de Lee et. al. (2009), foi utilizada a técnica de modificação da superfície das NPM com ânions oxalato e posterior substituição com lauril sulfato de sódio, com imobilização por adsorção hidrofóbica da lipase pancreática, apresentado estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura.

Os estudos com imobilização covalente através de coberturas poliméricas são os mais encontrados na bibliografia, apresentam uma boa estabilidade e atividade recuperada das enzimas, seu maior problema está na redução do potencial magnético dos derivados produzidos desta maneira. Uma alternativa a este problema é a modificação da superfície dos suportes com diferentes reagentes, sendo a utilização de APTS com glutaraldeído para obtenção de suportes estáveis a mais comum. Estudos com modificação da superfície com aminoácidos são mais encontrados em periódicos da área médica, com grande destaque para suas utilizações para extração de DNA ou proteínas, diagnóstico médico, separação de células, liberação controlada de fármacos ou até mesmo na aplicação no controle do crescimento e eliminação termogênica de células cancerígenas. (TIE et. al., 2006; UNAL et. al., 2010; JIN et. al., 2014). A utilização deste material para imobilização de enzimas pode ser proeminente devido aos grupos presentes nos aminoácidos que podem se ligar as enzimas por ligação covalente.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAIS

Para a síntese das nanopartículas magnéticas foram utilizados os reagentes sulfato de ferro II heptahidratado, sulfato de ferro III, oxalato de amônio monohidratado, hidróxido de amônio 32% (v/v), hidróxido de sódio, ácido clorídrico e ácido sulfúrico, todos grau PA ou equivalente da marca Vetec, os aminoácidos (arginina, cisteína, histidina, leucina e tirosina) e a ninhidrina da marca Sigma-Aldrich.

Glutaraldeído 25% em água (Sigma-Aldrich) foi utilizado para a ativação e alipase comercial *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (Novozymes) utilizada na imobilização no suporte de magnetita. A determinação da atividade hidrolítica foi realizada com o substrato sintético butirato de p-nitrofenila (pNPB) (Sigma-Aldrich). A determinação de proteínas foi realizada com o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). Os demais reagentes de grau analítico foram obtidos da Vetec.

### 4.2 MÉTODOS

#### 4.2.1 Síntese das nanopartículas de magnetita

Nanopartículas de magnetita funcionalizadas com aminoácidos foram produzidas pelo método em duas etapas descrito inicialmente por Tie et al. (2006) através da co-precipitação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em meio alcalino.

Na primeira etapa ocorre a síntese das partículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  contendo ânion oxalato ligado a sua superfície, a razão molar utilizada é de  $\text{Fe}^{3+}:\text{Fe}^{2+}:\text{C}_2\text{O}_4^{2-} = 2:1:1$ , para isso são adicionados inicialmente 11 g do sulfato de ferro II heptahidratado e 5,65 g de oxalato de amônio monohidratado a 300 mL de água destilada, agitando a suspensão até a dissolução total dos sais e formando o complexo  $\text{FeC}_2\text{O}_5$ , que confere uma cor amarela intensa. Então, 16 g de sulfato de ferro III foram adicionados a suspensão e a desoxigenação do meio reacional com  $\text{N}_2$  foi iniciada.

A suspensão foi aquecida até 75 °C e o pH foi ajustado com hidróxido de amônio 32% (v/v) até pH 9,0, ocorrendo a precipitação da magnetita. A agitação foi ajustada para 1200 rpm e as condições foram mantidas por 1 hora. No término as nanopartículas de magnetita modificadas com oxalato (NPM-Ox) foram separadas com o auxílio de um magneto e lavadas com água destilada até que a água de lavagem apresentasse um pH neutro. As partículas foram então reservadas ao abrigo de ar para a próxima etapa ou então liofilizadas para análises.

A segunda etapa trata da substituição do ânion oxalato por outro ligante em meio ácido. 3 g do precipitado de NPM-Ox obtido na primeira etapa do processo foram suspensos em 100 mL de água destilada e o pH ajustado para 5,0 (pH ajustado com HCl ou H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Um aminoácido (Arg, Cys, His, Leu, Tyr) foi então adicionado com uma razão molar (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>:AA = 10:1, 5:1, 2:1) também sob atmosfera de N<sub>2</sub> e a 75 °C, a reação foi conduzida por 1 h em banho de ultrassom (Marca Unique® modelo 1650) e sob agitação a 1500 rpm durante todo o processo. Após completa a reação, as nanopartículas de magnetita funcionalizadas com aminoácidos (NPM-AA) foram separadas com o auxílio de um magneto, lavadas com água destilada cinco vezes e então liofilizadas até total sublimação da água.

A síntese de magnetita pura (NPM) seguiu a mesma metodologia, apenas sem a adição do íon oxalato na primeira etapa e de aminoácidos na segunda etapa. Foram ainda sintetizadas nanopartículas com oxalato na primeira etapa que seguiram por uma segunda etapa sem a adição de aminoácidos para se avaliar o efeito deste ligante no processo.

#### **4.2.2 Determinação do teor de aminoácidos**

A determinação do teor de aminoácidos imobilizados no suporte foi realizada pelo método da ninidrina (SUN et. al., 2005), que consiste no aumento da absorvância na região de 570 nm com a concentração de aminoácidos presentes em solução. O reagente foi preparado dissolvendo 2 g de ninidrina em 75 mL de acetona sob atmosfera de N<sub>2</sub>, após a adição de 25 mL de tampão acetato de sódio pH 5,0 a solução foi nitrogenada por mais 2 minutos e então vedada e armazenada em geladeira para utilização durante o dia.

Os ensaios foram realizados coletando amostras de 100  $\mu\text{L}$  do sobrenadante durante a segunda etapa da reação de síntese das nanopartículas e dissolvendo para 1 mL com água destilada em tubos de ensaio com tampa vedante, 1 mL da solução de ninidrina foi adicionado e os tubos fechados e aquecidos em banho de água fervente por 10 minutos. Após o aquecimento as amostras foram resfriadas em banho de gelo por 15 minutos e então os tubos foram abertos e foram adicionados 5 mL de uma solução de etanol 50% (v/v), as misturas foram agitadas por 15 segundos com auxílio de um vortex e seguiram para leitura em absorvância de 570 nm em espectrofotômetro (Marca Hitachi® modelo U-2900). A absorvância é anotada e a concentração de aminoácido no sobrenadante é obtida com auxílio da equação da curva de calibração feita com soluções de aminoácidos com concentrações conhecidas. Todos os ensaios foram realizados em triplicata, com três experimentos independentes sendo realizados simultaneamente.

#### 4.2.3 Determinação da estrutura e morfologia

A difratometria de raios-x (DRX) revela as informações sobre a forma cristalina presente no suporte assim como o tamanho das partículas presentes. A análise foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. O difratômetro utilizado foi o modelo Cad-4 da marca Enraf-Nonious®. As amostras foram analisadas com uma variação angular de  $2\theta$ , com passo de  $0,02^\circ$ , tempo de passo de 1 s e radiação  $\text{CuK}\alpha$  (40 kV/30 mA) e comprimento de onda de 1,5406 nm.

O tamanho médio das partículas foi calculado segundo duas equações, a primeira a Lei de Braag (equação 3), que relaciona a ordem de difração ( $n$ ), o comprimento de onda ( $\lambda$ ), o ângulo do feixe ( $\theta$ ) do raio-X incidente e a distância interplanar ( $d_{hkl}$ ).

$$n\lambda = 2d\text{sen}\theta \quad (3)$$

Associando a equação de Braag com a Lei de Miller, que condiz com as coordenadas do plano cristalino e o parâmetro de rede “*a*”, que determina o tamanho médio do cristalino. Para um sistema cúbico se obtém a equação 4.

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{(h^2 + k^2 + l^2)}} \quad (4)$$

#### 4.2.4 Determinação da composição química

A leitura dos espectros do infravermelho identifica os principais grupamentos funcionais presentes no suporte, foram obtidos em um espectrômetro modelo Cary 600 Series FTIR Spectrometer da marca Agilent Technologies®, as amostras foram prensadas em pastilhas de KBr e o espectro foi medido na região entre 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ .

#### 4.2.5 Determinação das propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas dos suportes sintetizados foram determinadas através de ensaios utilizando um magnetômetro de amostra vibrante (MAV) do laboratório de física (LFFS) da Universidade Federal de Santa Catarina, da marca Magmet Systems®, modelo 3473-70 Electromagnet, operando com campos magnéticos entre -20 e 20 kOe.

#### 4.2.6 Determinação do potencial zeta

A medida potencial zeta das nanopartículas foi realizada no laboratório de controle de processos (LCP), no equipamento Stabino® NANO-flex® System. As amostras foram preparadas suspendendo as nanopartículas em água destilada com concentrações de 1 g/L, o pH foi então ajustado para 11 pela adição de NaOH e então as soluções foram mantidas por 15 min em banho de ultrassom em temperatura ambiente.

Para a análise, 3 mL da amostra foi adicionada ao aparelho onde foram realizadas as leituras do potencial com uma variação do pH de 11 para 3, a titulação foi realizada com uma solução de HCl 0,1 M.

#### **4.2.7 Ativação do suporte com Glutaraldeído**

Após a funcionalização do suporte com aminoácidos, a ativação foi realizada com solução de Glutaraldeído 5% (v/v) por 1 h a 25 °C e após a ativação as nanopartículas foram lavadas com água destilada 5 vezes para a retirada do excesso de agente ativador, de acordo com metodologia apresentada por (SILVA et. al., 2012).

#### **4.2.8 Imobilização da Lipase**

Para a imobilização da lipase 1 mL do preparado enzimático comercial de TLL foram adicionados em 20 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM e pH 7,0. Então 1 g do suporte de NPM-AA foi pesado e adicionado a solução e a mistura foi agitada mecanicamente a 300 rpm. O acompanhamento da imobilização foi avaliado observando o decréscimo da atividade enzimática e do teor de proteínas no sobrenadante, para isto foram coletadas amostras de 100 µL nos tempos 0, 15, 30 e 60 minutos. Ao término da reação, as partículas foram decantadas com auxílio de um magneto e lavadas exaustivamente com água destilada.

#### **4.2.9 Determinação das proteínas totais**

O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976), utilizando albumina bovina como solução padrão.

#### **4.2.10 Determinação da atividade hidrolítica**

O butirato de *p*-nitrofenila (*p*NPB) é hidrolisado pela enzima em meio aquoso formando o *p*-nitrofenol (*p*NP), provocando um aumento na absorbância na faixa de  $\lambda = 348$  nm. A atividade enzimática pode ser detectada por método colorimétrico. Inicialmente se prepara o substrato sintético de *p*NPB em acetonitrila com

concentração de pNPB 50 mM. Então 20 µL de uma amostra de extrato enzimático é adicionada a 2,5 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM pH 7,0 e a reação é iniciada com a adição de 20 µL da solução de substrato de pNPB 50 mM. A reação ocorreu em um tubo de ensaio agitado em vortex por 30 segundos e a absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS modelo U-2900 da marca Hitachi em tempos de 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0 minutos, a fim de determinar a tangente da região linear. Uma unidade (U) de atividade enzimática de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima necessária para a liberação de 1 µmol de pNP por minuto nas condições da reação. A atividade enzimática foi calculada de acordo com a equação 5:

$$A_T = \frac{\sigma \cdot V_{total}}{E \cdot c \cdot V_{enzima}} \quad (5)$$

Onde:

$A_T$  = Atividade hidrolítica total do derivado enzimático [U/mL];

$\sigma$  = coeficiente angular da reta absorbância x tempo [ $\text{min}^{-1}$ ];

$V_{total}$  = Volume total do meio reacional [mL];

$E$  = Coeficiente de extinção molar do substrato [ $1/\mu\text{M cm}$ ];

$c$  = caminho ótico [cm];

$V_{enzima}$  = Volume de derivado enzimático [mL];

O coeficiente de extinção molar para o pNPB é de 5,15  $1/\mu\text{M cm}$  e o caminho ótico de 1 cm. A atividade específica do derivado relaciona a atividade hidrolítica total com a massa de suporte utilizado na imobilização, conforme a equação 6:

$$A_E = \frac{A_T}{m_{suporte}} \times V_{enzima} \quad (6)$$

Onde:

$A_E$  = Atividade hidrolítica específica do derivado enzimático [U/g];

$A_T$  = Atividade hidrolítica total do derivado enzimático [U/mL];

$m_{\text{suporte}}$  = massa de suporte na amostra [g];

$V_{\text{enzima}}$  = Volume de derivado enzimático [mL];

O rendimento da imobilização foi calculado a partir da equação 7:

$$RI(\%) = \left( \frac{A_i - A_f}{A_i} \right) \times 100 \quad (7)$$

Onde:

$RI$  = Rendimento da imobilização [%];

$A_i$  = Atividade enzimática no sobrenadante no início da reação [U/g];

$A_f$  = Atividade enzimática no sobrenadante ao final da reação [U/g];

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese do compósito de nanopartículas magnéticas e aminoácido (NPM-AA)

Na primeira etapa do processo ocorre a síntese das nanopartículas magnéticas modificadas com o íon oxalato, a influência dos fatores de desoxigenação, pH, temperatura e agitação mostraram ser de extrema importância nesta etapa do processo, onde a formação de partículas de boa qualidade foi observada de forma qualitativa.

Devido à fácil oxidação da magnetita em maguemita na presença de oxigênio, a desoxigenação com  $N_2$  foi rigorosamente acompanhada e contínua durante todo o processo. Igual atenção foi dada na adição do hidróxido de amônio no aumento do pH; em valores abaixo de 8,5 a formação de maguemita é favorecida e em valores acima de 9 a oxidação é dificultada, favorecendo a coordenação do ânion oxalato com os átomos de ferro livres na superfície. Em ambos os casos, a coloração do meio reacional ajudava a visualizar uma possível oxidação, com as

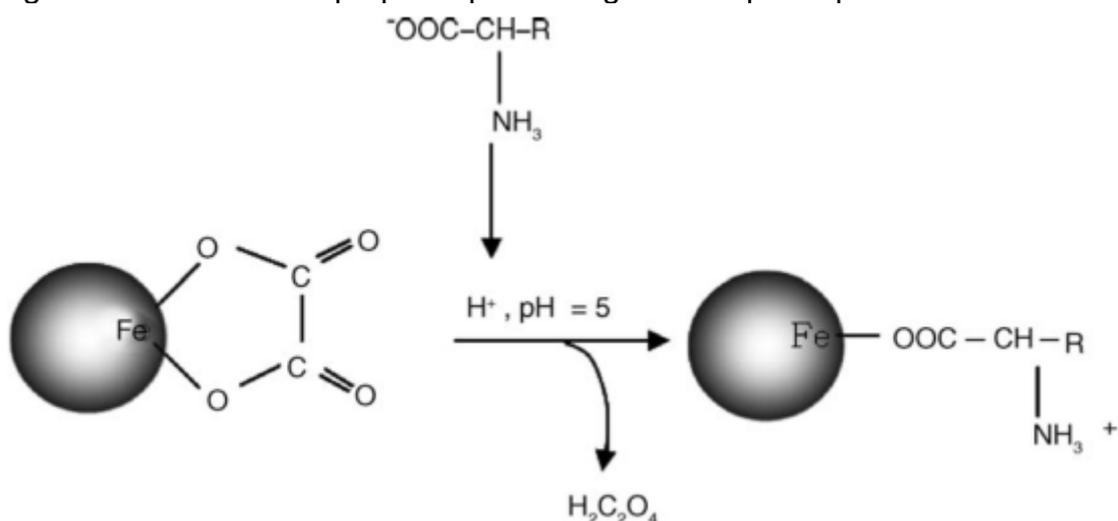
nanopartículas de magnetita apresentando uma coloração preta enquanto a formação de maguemita apresentava uma coloração castanho-avermelhada.

Quanto à temperatura do processo de síntese, observou-se que quando em valores se trabalhou que temperaturas abaixo de 65 °C, as partículas perdiam estabilidade e um produto de aspecto pastoso era formado.

A importância da agitação e do ultrassom diz respeito ao tamanho final das partículas formadas, ambos ajudaram a obter partículas de tamanho menor e mais uniformes devido à adição de energia ao meio, que desestabiliza a formação de grânulos maiores.

Na segunda etapa do processo ocorre a substituição do ânion oxalato pelo aminoácido utilizado. Tie *et. al.* (2006) propõem um modelo, como mostra a Figura 11, onde propõem que uma ligação bidentada do ânion oxalato ao suporte é substituída por uma ligação monodentada do aminoácido utilizado com o suporte. Outros mecanismos de ligação podem ocorrer, pode-se imaginar uma ligação bidentada do grupo carboxílico do aminoácido, interações iônicas entre o polo negativo do aminoácido com a superfície, ligações tipo ponte de hidrogênio entre os grupos hidroxilas e os grupos aminas presentes, além de várias outras interações entre os grupos encontrados nas cadeias laterais dos aminoácidos, como a possível ligação entre o grupo tiol presente na cisteína e a superfície.

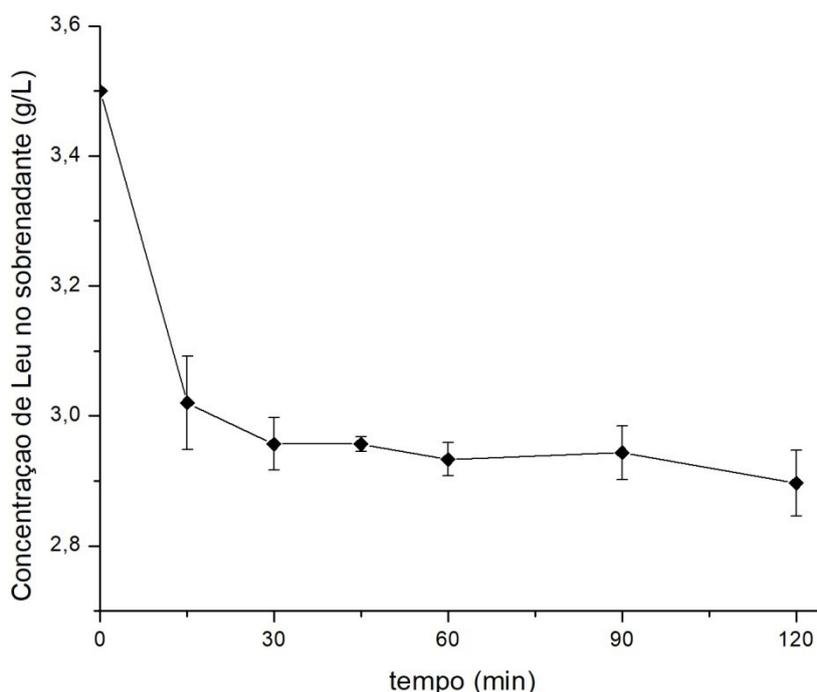
Figura 11 - Mecanismo proposto para a segunda etapa do processo de síntese



Fonte: TIE *et. al.* (2006)

O tempo de reação da segunda etapa foi analisado pela concentração dos aminoácidos presentes no sobrenadante pelo método da ninidrina e pode ser visualizado na Figura 12. Os experimentos foram realizados utilizando o aminoácido Leucina, em pH 5,0 e com a razão molar  $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{AA} = 5:1$ . A concentração da Leucina reduziu drasticamente nos primeiros 15 minutos de reação, uma redução menor ocorreu até o tempo de 45 minutos e uma estabilidade no seu valor foi alcançado até o tempo final de 2 horas. A temperatura do meio reacional e a desoxigenação foram importantes para evitar a formação de maguemita e para auxiliar no desprendimento do ânion oxalato da partícula, contudo a variável mais impactante nesta segunda etapa foi o do pH, sendo este analisado com maior profundidade, com diferentes valores de pH na segunda etapa do processo.

Figura 12 - Concentração do aminoácido Leucina no sobrenadante ao longo da segunda etapa da síntese com razão molar  $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{Leu} = 5:1$ ,  $75^\circ\text{C}$  e pH 5,0



Fonte: Elaborado pelo Autor

A quantidade de aminoácido utilizada durante a segunda etapa da reação também foi analisada, soluções de Leucina com as razões molares  $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{AA} = 10:1$ ,  $5:1$  e  $2:1$ , foram testadas. A Tabela 3 apresenta os resultados quantificados pelo método da ninidrina através da análise do sobrenadante após 1 hora de reação para as diferentes razões molares utilizadas.

Tabela 3 - Concentração de aminoácido Leucina no sobrenadante durante a segunda etapa de reação

Razão Molar Leu: $\text{Fe}_3\text{O}_4$	$C_{\text{inicial}}$ (g/L)	$C_{\text{final}}$ (g/L)	Redução (mg)	Redução (%)
1:10	1,70	1,20	50	29,41
1:5	3,50	2,89	61	17,43
1:2	8,50	8,12	38	4,47

Fonte: Elaborado pelo Autor

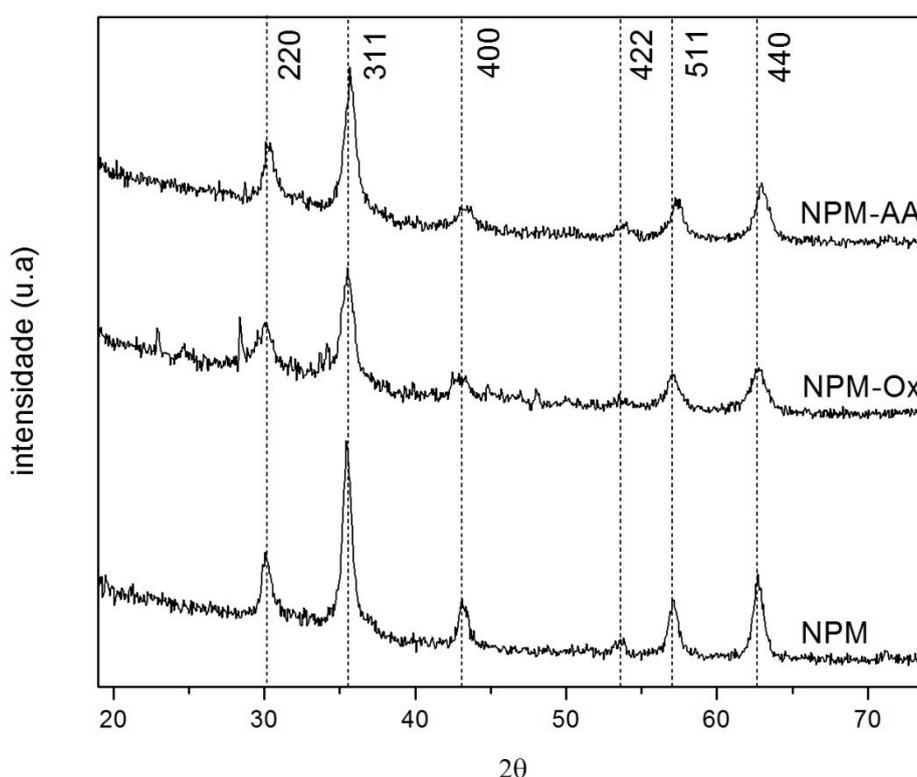
Os resultados mostram que quanto menor a concentração do aminoácido Leucina utilizado, maior é o percentual de redução no sobrenadante, contudo, a massa de aminoácido substituída foi maior na concentração intermediária de 3,5 g/L (razão molar  $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{AA}$  de 5:1). Na maior concentração de aminoácido utilizada, ocorreram também problemas com a dissolução da Leucina; grânulos não dissolvidos eram visualizados no reator, mesmo sob forte agitação e aquecimento do meio reacional. O comportamento apresentado para a Leucina é esperado para os outros aminoácidos utilizados, sendo que os experimentos realizados posteriormente foram conduzidos com tempos de reação de uma hora e com uma razão molar  $\text{Fe}_3\text{O}_4:\text{AA}$  de 5:1.

## 5.2 Estrutura química e tamanho do compósito NPM-AA

A primeira etapa de caracterização do suporte foi realizada pela análise de difração de raios-X. Com os dados obtidos, foi realizado o cálculo do diâmetro médio das partículas através das Equações 3 e 4. As partículas de magnetita pura (NPM) mostraram um tamanho médio de  $7,97 \pm 0,68$  nm, a adição do ânion oxalato ou sua substituição por um aminoácido não apresentaram mudança significativa nos valores do diâmetro médio da partícula, sendo calculados os valores de  $7,96 \pm 0,68$  nm para as partículas de NPM-Ox e de  $7,94 \pm 0,67$  nm para as partículas de NPM-AA.

A Figura 13 mostra os difratogramas obtidos pela análise das partículas de NPM, NPM-Ox e NPM-AA. De acordo com o banco de dados JCPDS 19-0629, os principais picos característicos da magnetita se encontram em  $2\theta = 30,095$  (220);  $35,422$  (311);  $43,052$  (400);  $53,391$  (422);  $56,942$  (511) e  $62,515$  (440).

Figura 13 - Difratograma de raios-X para a magnetita pura (NPM) e modificadas (NPM-Ox) ou o aminoácido Histidina (NPM-AA)

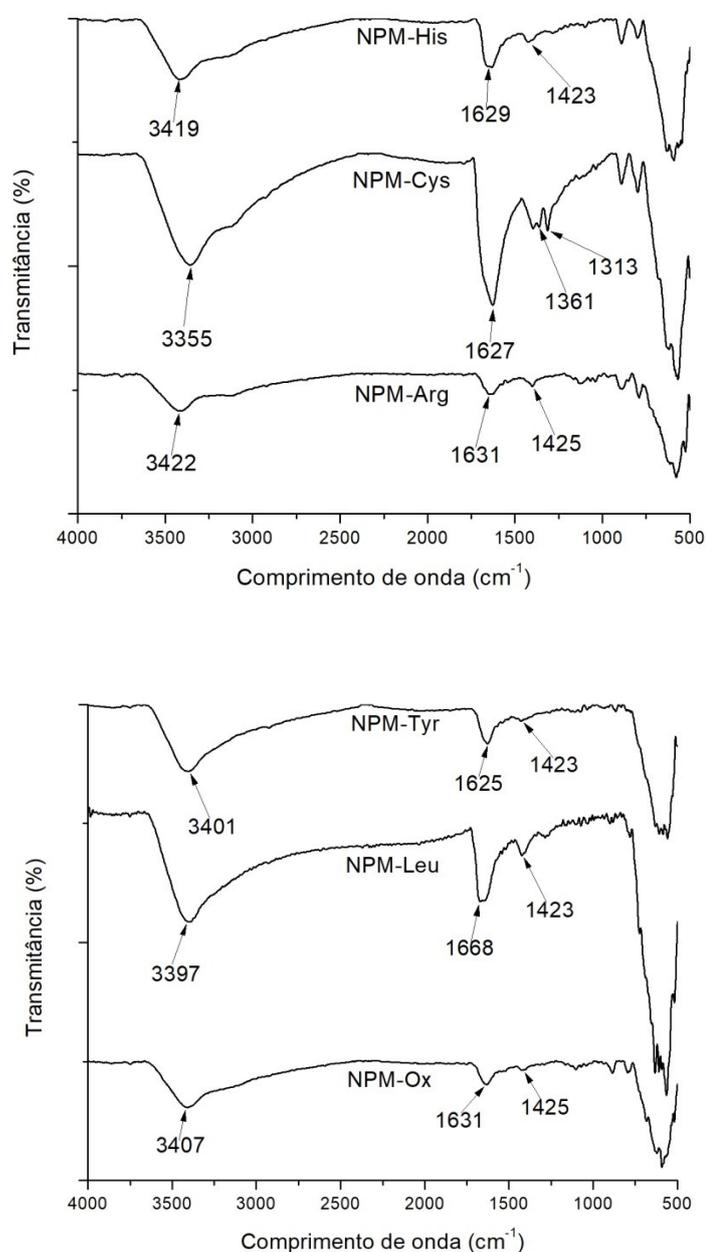


Fonte: Elaborado pelo Autor

A análise dos picos mostra que o processo de síntese não provocou alterações na estrutura cristalina do material, indicando a formação de magnetita com estrutura cristalina e livre de impurezas. O difratograma mostra que o meio reacional se encontrava livre de oxigênio, pois nessa situação apareceriam picos referentes à maguemita ou até mesmo a hematita devido à oxidação do ferro II a ferro III.

A substituição dos ligantes às partículas foi analisada através da técnica de FTIR. Os espectrogramas obtidos para as partículas modificadas com oxalato e com os aminoácidos são apresentados na Figura 14, com a partícula de oxalato sendo produzida apenas pela primeira etapa do processo e as partículas com aminoácidos passando pela segunda etapa de síntese, onde o aminoácido (Arg, Cys, His, Leu ou Tyr) é adicionado à reação em meio ácido.

Figura 14 - Espectro de FTIR das partículas de NPM-Ox, Arg, Cys, His, Leu e Tyr



Fonte: Elaborado pelo Autor

Em todas as amostras consegue-se observar a presença de picos com maior intensidade em relação aos outros na região entre  $560 - 620 \text{ cm}^{-1}$ , que podem ser atribuídas às ligações Fe-O, confirmando a presença de magnetita no material estudado. Outro sinal presente em todos os espectrogramas é evidenciado entre  $3420 - 3350 \text{ cm}^{-1}$ , sendo atribuído às ligações entre a superfície e grupos  $\text{OH}^-$ , como também ao estiramento de grupos N-H (WANG et. al.; 2010).

A vibração entre os estiramentos simétricos dos íons carboxílicos ( $\text{COO}^-$ ) é visualizada entre os comprimentos de onda de  $1630$  e  $1400 \text{ cm}^{-1}$  respectivamente (PARK et al., 2009; PATEL et. al., 2009). Estes sinais podem ser observados com todos os ligantes utilizados, sendo que o alargamento destas bandas indica adsorção à superfície (RODDICK- LANZILOTTA, McQUILLIAN; 2000). Para a partícula com oxalato, a diferença entre estas vibrações ( $\Delta v_{\text{as-s}}$ ) tem um valor de 206, o que indica a formação de uma ligação bidentada (TIE et. al., 2006), em igual situação estão às partículas modificadas com Tirosina e com Histidina, e com um maior valor de  $\Delta v_{\text{as-s}}$  estão Arginina, Leucina e Cisteína indicando uma ligação monodentada.

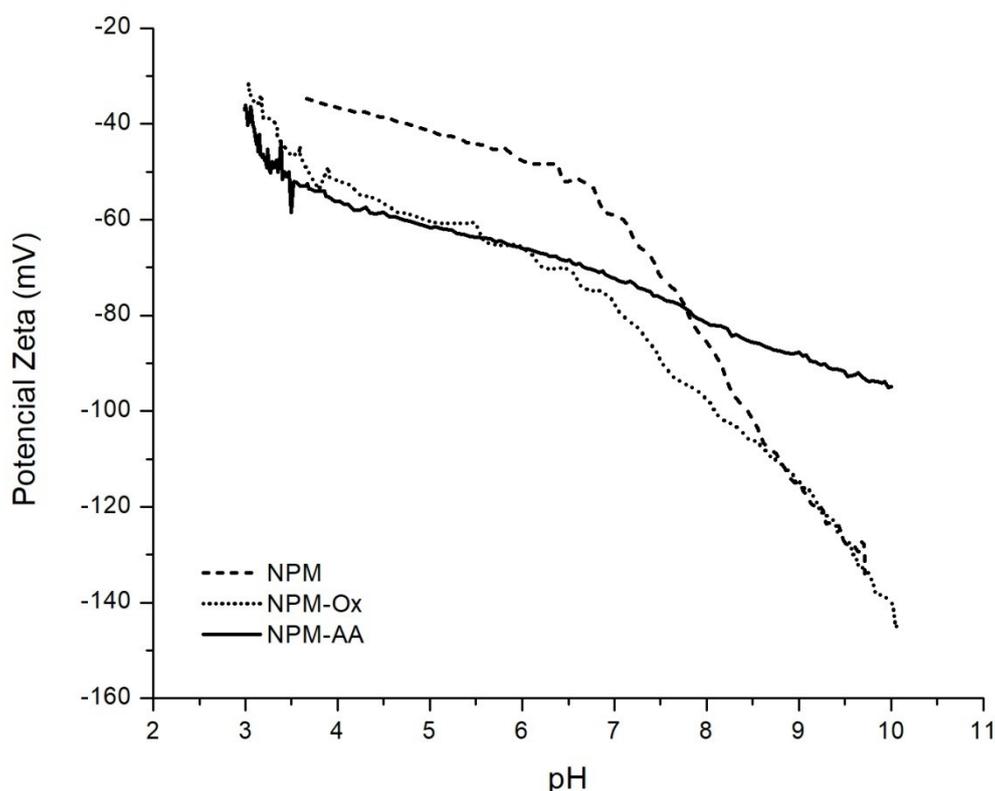
Foi observado que a cisteína apresentou um mecanismo diferente de associação. VIEIRA et al. (2011) discutem que isto pode ser devido a formação de uma cistina pela redução de duas cisteínas formando uma ligação S-S.

Os picos em  $1630 \text{ cm}^{-1}$  e em  $1420 \text{ cm}^{-1}$  são característicos das vibrações entre os estiramentos assimétricos e simétricos do ânion carboxílico ( $\text{COO}^-$ ) (PARK et al., 2009; PATEL et. al., 2009), com uma variação de até  $210 \text{ cm}^{-1}$  sendo característica de uma ligação bidentada entre o ânion e o metal na superfície (TIE et. al., 2006). Demonstraram ter uma interação bidentada as partículas modificadas com oxalato, tirosina e histidina. Casos de ligações monodentadas estão ligadas a uma maior divisão entre os estiramentos como acontece com os aminoácidos Arginina e Leucina

### 5.3 Estabilidade coloidal

Quando em meio aquoso, as partículas de magnetita têm a superfície hidratada, sendo totalmente recoberta por grupos  $\text{OH}^-$  ligados aos cátions de Fe livres na superfície do material. Dependendo do pH do meio, estes sítios hidroxilados podem se dissociar, variando a estabilidade coloidal das partículas. Os ligantes adicionados nas duas etapas deste trabalho devem fornecer uma maior estabilidade a estas partículas. As medidas do potencial zeta em função do pH para as partículas de NPM, NPM-Ox e NPM-AA (Leucina) se encontram na Figura 15.

Figura 15 - Potencial zeta em função do pH pra as amostras de NPM, NPM-Ox e NPM-AA



Fonte: Elaborado pelo Autor

De modo geral, quando o valor do potencial se encontra na faixa de -30 mV a 30 mV, as forças de atração entre as partículas superam as de repulsão, havendo formação de agregados que podem coagular ou flocular. Nas três amostras

analisadas, os valores se encontram abaixo de -30 mV, podendo considerar as amostras estáveis, com baixa tendência a aglomeração.

Porém, estes resultados não estão de acordo com outros estudos realizados até o momento, principalmente em relação às partículas de magnetita pura. No trabalho de Edermoglu e Sarikaya (2006) foram testados os efeitos do ânion oxalato e de metais pesados no potencial zeta de partículas de magnetita, os valores obtidos mostram um ponto isoeletrônico ( $pH_{IE}$ ), que é quando ocorre a reversão do potencial de valores negativos para positivos, em torno de pH 5,0 para as partículas com ânion oxalato e próximo a 6,0 para partículas de magnetita pura. Ainda com relação às partículas de magnetita pura, os autores listam vários outros trabalhos comparando os pontos isoelétricos de várias partículas de magnetita naturais ou sintetizadas por diferentes metodologias, os valores de  $pH_{IE}$  assumem valores entre 6,8 e 4,2, com a maioria em valores próximos a 6. Estas variações ocorrem, pois, o  $pH_{IE}$  depende de vários fatores como a composição da amostra, método de preparação do material ou a origem da magnetita.

A maior estabilidade das partículas com ânion oxalato, em comparação com as realizadas no trabalho de Edermoglu e Sarikaya (2006), pode ocorrer devido ao método de síntese utilizado. No trabalho de referência, os grupos de oxalato reagem com uma partícula de magnetita já formada, que apresenta pouca interação para a formação dos quelatos bidentados entre a superfície e o ânion. A interação do ânion no processo de formação das partículas, utilizado no presente trabalho, gera uma maior interação entre a NPM e o oxalato, podendo causar maior estabilidade final no produto sintetizado, com maior número de ligações deste ânion com a superfície do material magnético.

#### 5.4 Propriedades magnéticas

Foram estudadas três diferentes amostras pela análise de MAV, partículas de magnetita sintetizadas sem a adição de nenhum ligante nas duas etapas, partículas com oxalato que passaram apenas pela primeira etapa e partículas com Histidina adicionada na segunda etapa da reação. As curvas de magnetização

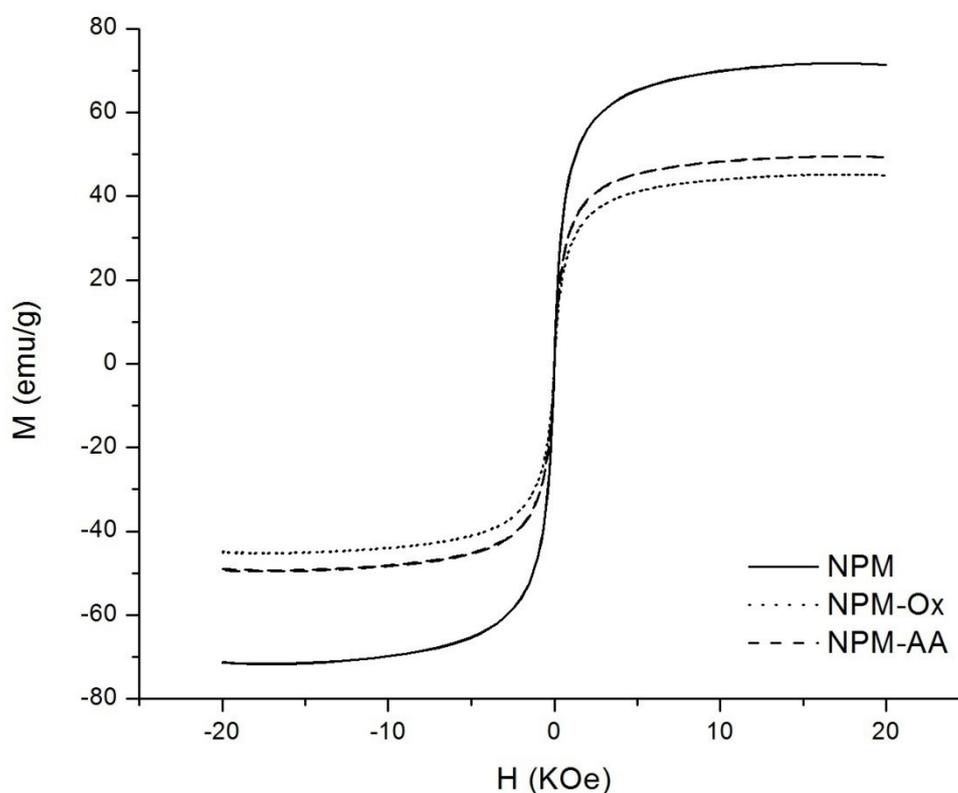
podem ser visualizadas na Figura 16 e os valores de  $H_c$ ,  $M_r$  e  $M_s$  obtidos estão na tabela 4.

Tabela 4 - Valores de magnetização das nanopartículas magnéticas

Amostra	$H_c$ (kOe)	$M_r$ (emu/g)	$M_s$ (emu/g)
NPM	0,005	0,023	71,72
NPM-Ox	0,017	0,089	45,01
NPM-AA	0,017	0,301	49,41

Fonte: Elaborado pelo Autor

Figura 16 - Curvas de magnetização das partículas de NPM, NPM-Ox e NPM-AA



Fonte: Elaborado pelo Autor

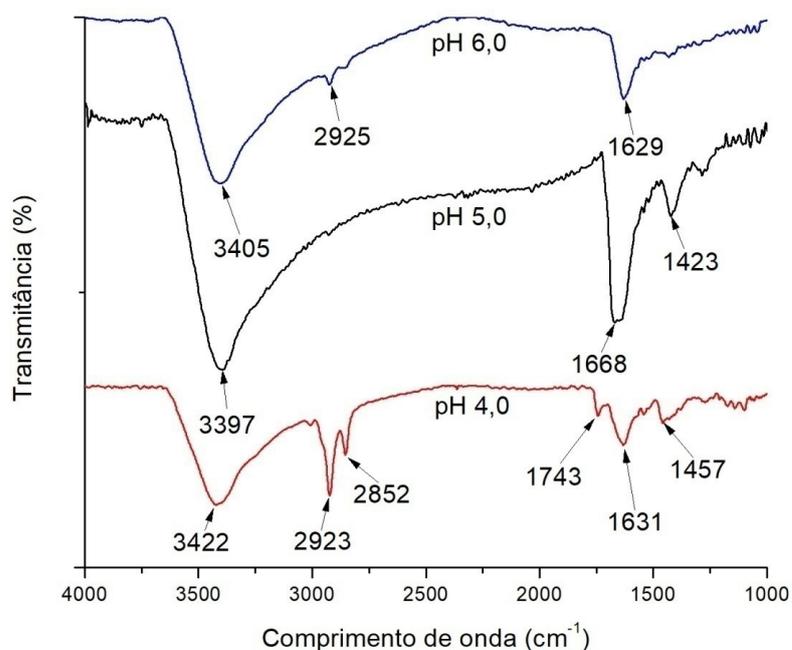
As curvas não mostram comportamento com histerese para nenhuma das amostras, com valores de  $M_r$  e  $H_c$  muito próximos a zero, que caracteriza partículas com um comportamento superparamagnético. Os valores de  $M_s$  para a magnetita se encontram na faixa de 60-90 emu/g de acordo com a literatura (ZHAO et.al., 2010), que vão ao encontro dos valores para a magnetita pura. O valor da magnetização das amostras de magnetita modificadas com oxalato e aminoácidos mostram valores menores, entretanto, isto é esperado, pois tais modificações mostram uma redução

nos valores da magnetização em outros trabalhos, contudo estes valores ainda são maiores do que os obtidos por outras metodologias que utilizam encapsulação com polímeros (TIE et. al., 2006).

### 5.5 Efeitos do pH durante a segunda etapa do processo sobre o teor de aminoácidos ligados a superfície da nanopartícula magnética

Para investigar o efeito do pH na segunda etapa do processo, as partículas de NPM-Ox foram produzidas na primeira etapa e seguiram para a segunda etapa em diferentes valores de pH. Durante a segunda etapa do processo foram recolhidas alíquotas do sobrenadante para análise do teor de aminoácidos com ninidrina e ao final da reação as partículas foram liofilizadas e enviadas para análise de infravermelho. A Figura 17 apresenta os espectrogramas obtidos das partículas liofilizadas.

Figura 17 - Espectro de FTIR do efeito do pH do meio durante a segunda etapa do processo de síntese



Fonte: Elaborado pelo Autor

A avaliação da quantidade de aminoácido no sobrenadante mostra que em pH 6,0 apenas uma parte muito pequena de aminoácido é ligado a partícula, em pH 5,0 este valor chega em um percentual de 2% da massa total do material, tendo uma queda para 1,26% quando em pH 4. No espectro apresentado na Figura 17, pode-se visualizar que as bandas características do estiramento assimétrico e simétrico do ânion carboxílico são muito mais intensas quando o pH do meio é 5,0. Percebe-se que em pH 6,0 a vibração do estiramento simétrico é muito mais fraca, podendo já ter iniciado a dessorção do oxalato, mas sem este ser substituído pelo aminoácido. Devido a isto, é importante que a correção do pH do meio seja realizada antes do início da reação ou de maneira abrupta, com o pH indo diretamente do meio neutro para pH 5,0. Vale notar que quando em pH 4,0, dois sinais em 2923 e 2852  $\text{cm}^{-1}$  se sobressaem, estes sinais são atribuídos ao estiramento das ligações C-H e  $\text{CH}_2$  que estão presentes nos aminoácidos (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998); isso mostra que mesmo em pH mais baixos, ainda ocorre interação entre a superfície e os aminoácidos.

### 5.6 Influência do ânion oxalato no processo de síntese da nanopartícula magnética

Com o propósito de estudar o papel do ânion oxalato durante o processo de síntese em duas etapas, os experimentos listados na Tabela 5 foram realizados e as partículas produzidas foram liofilizadas e levadas para análise de FTIR.

Tabela 5 - Variações no processo de síntese

Experimento	Primeira etapa		Segunda etapa	
	Reagente	pH	Reagente	pH
A	$\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	9,0	Leucina	5,0
B	-	9,0	$\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	5,0
C	$\text{C}_2\text{O}_4^{2-}$	9,0	x	x
D	-	9,0	-	5,0

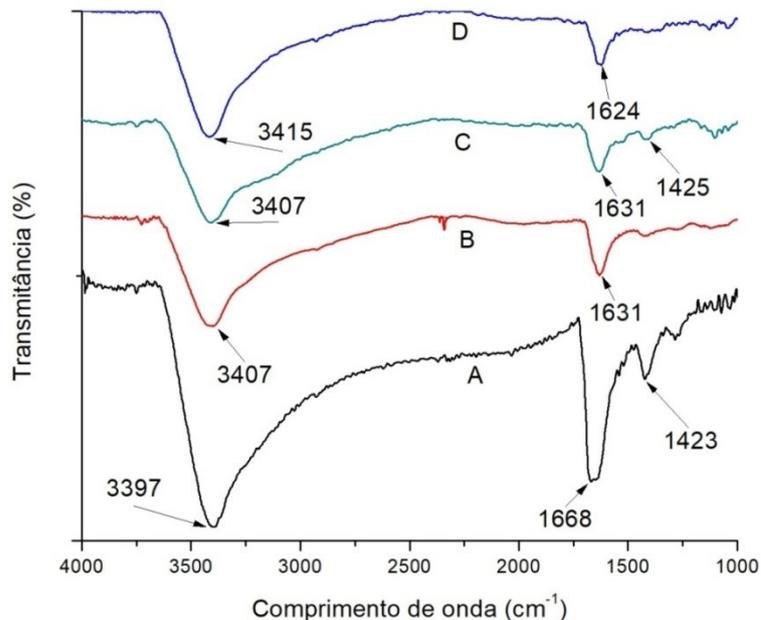
Fonte: Elaborado pelo Autor

O experimento A segue a rotina previamente descrita na metodologia, com a adição de oxalato na primeira etapa do processo seguido pela adição de um aminoácido durante a segunda etapa de reação. Em B, a primeira etapa ocorre sem a adição do ânion, apenas com o ajuste do pH do meio para 9,0 com hidróxido de

amônio, onde, após finalizado o tempo de reação, passou pela segunda etapa do processo em pH ácido com a presença do ânion oxalato. O processo C foi a realização apenas da primeira etapa, não passando pela etapa ácida. Finalmente em D, não se foi adicionado o ânion oxalato em nenhuma das etapas, acontecendo a reação apenas com as partículas nuas de magnetita.

O espectrograma apresentado na Figura 18 mostra os picos característicos do estiramento assimétrico e simétrico do ânion carboxílico, respectivamente em  $1630\text{ cm}^{-1}$  e  $1420\text{ cm}^{-1}$ , nos experimentos A e C, enquanto em C e D apenas o primeiro é evidente. Isso indica que o ânion oxalato só consegue se ligar à superfície da partícula de magnetita quando em meio alcalino, sendo que, quando em pH ácido, a estabilidade da ligação entre o ânion e os cátions da superfície é menor, o que resulta na substituição do oxalato pelo aminoácido.

Figura 18 - Espectro de FTIR do efeito do ânion oxalato na ligação dos aminoácidos à superfície da magnetita

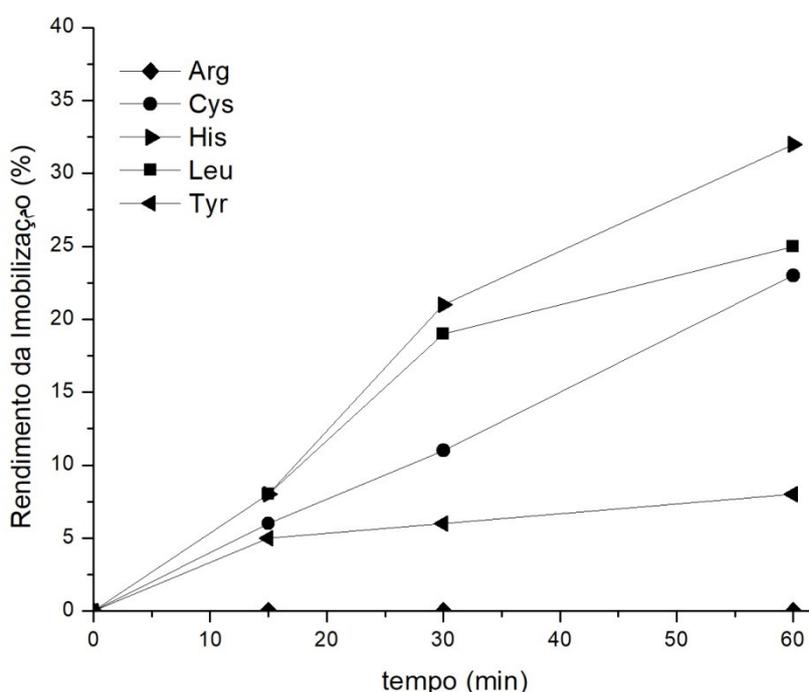


Fonte: Elaborado pelo Autor

### 5.7 Imobilização da Lipase TLL no suporte de NPM-AA

Foram realizados experimentos na tentativa de ligar a enzima TLL diretamente no suporte, modificado apenas com aminoácidos, sem passar pela etapa de ativação com glutaraldeído. A presença do aminoácido na superfície possibilitou a ligação da enzima ao suporte. Para todas as amostras foi fornecida uma atividade específica da solução enzimática de  $215,0 \pm 12,0$  U/g de suporte e uma carga de 1,3 mg de proteína para cada g de suporte. O suporte modificado com histidina foi o que apresentou melhor resultado com valor de rendimento de imobilização de 32% em uma hora de contato. A atividade obtida no derivado foi de  $145,3 \pm 17,0$  U/g de suporte. O rendimento de imobilização dos derivados produzidos com todos aminoácidos pode ser visualizado na Figura 19.

Figura 19 - Rendimento de imobilização da TLL nos suportes modificados com Arginina, Cisteína, Histidina, Leucina e Tirosina utilizando 1,3 mg de proteína para cada 1 g de suporte em temperatura ambiente e sem ativação com glutaraldeído



Fonte: Elaborado pelo Autor

O rendimento do processo ainda está em aumento para alguns aminoácidos, não tendo chego até a estabilização do processo de imobilização. O suporte

modificado com arginina não apresentou imobilização da enzima ao longo do processo, este comportamento pode ser atribuído a baixa substituição que este aminoácido teve na segunda etapa do processo devido ao seu alto ponto isoelétrico.

Visando uma imobilização mais eficiente, foi realizada a ativação do suporte de Histidina e Leucina com glutaraldeído 5% (v/v) por 1 hora a temperatura ambiente. Após imobilização os suportes foram submetidos a um novo teste com mesmo tempo de contato de 60 minutos, onde o rendimento de imobilização do suporte com histidina atingiu um valor de 74% e a Leucina 57%.

## 6 CONCLUSÕES

Nanocompósitos de magnetita e aminoácidos foram sintetizados com sucesso através de método proposto em duas etapas: formação do compósito magnetita-oxalato e substituição do oxalato por aminoácidos. Foi possível obter os nanocompósitos de forma estável com os seguintes aminoácidos: arginina, cisteína, histidina e leucina e tirosina.

As variáveis desoxigeração, temperatura e pH do meio de reação mostraram ser importantes para a obtenção do nanocompósito de magnetita-oxalato. A manutenção de um ambiente anóxico, bem como pHs acima de 9 e temperaturas acima de 65°C evitam a oxidação da magnetita na primeira etapa do processo.

Os pHs ácidos mostraram ser ideais para a perda de estabilidade do oxalato e, conseqüente, substituição do oxalato por aminoácidos. Embora a substituição do oxalato ocorra em toda faixa de pH testada (de 4 a 6), há um claro favorecimento do processo no pH 5.

A utilização do ânion oxalato, durante a primeira etapa do processo, ajuda a dar maior estabilidade à magnetita e protege os cátions presentes na superfície, facilitando a adsorção/ligação do aminoácido durante a segunda etapa do processo.

A caracterização do material pela técnica de difração de raios-X confirma que a magnetita foi formada, com tamanho médio de  $7,94 \pm 0,67$  nm para as partículas de NPM-AA. Pela análise de magnetometria, a NPM-AA apresentou uma magnetização de saturação em torno de 50 emu/g e um comportamento superparamagnético, que permite a manipulação deste material pela aplicação de um campo magnético. Comparando os difratogramas para as diferentes amostras de NPM, NPM-Ox e NPM-AA se observou que não houve oxidação das partículas de magnetita a maguemita nas diferentes etapas reacionais.

A análise dos espectrogramas mostrou que as ligações entre os aminoácidos e os cátions presentes na superfície do nanomaterial são de um mecanismo complexo, sendo diferenciado para cada tipo de aminoácido e meio reacional. Arginina e Leucina aparentam ter uma ligação monodentada de seu grupo carboxila com a superfície, enquanto a Tirosina e a Histidina apresentam características de uma ligação bidentada. A Cisteína tem uma forma particular de

interação com a superfície da NPM, possivelmente com seu grupo tiol formando ligações com outro grupamento tiol de outra cisteína e formando uma molécula de cistina. Com exceção da cisteína, as cadeias laterais dos outros aminoácidos não interagiram com a superfície, mostrando que o principal agente de ligação é o grupo carboxílico.

Foi possível a imobilização da lipase TLL no suporte de NPM-AA com rendimento de imobilização de até 32 % da atividade da enzima livre em 1 hora de contato. A ativação do suporte com glutaraldeído melhorou o rendimento da imobilização com Histidina para 72% com o mesmo tempo de contato.

## REFERÊNCIAS

ALVES, T. M. M. T. **Síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro para aplicações biomédicas**. 83 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Universidade Estadual de Campinas – SP, 2007.

ANDRADE, L. H. et al. Kinetic resolution of a drug precursor by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized by different methodologies on superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, n. 1-2, p. 55-62, 2010.

ANDRADE, M. F. C. et al. Lipase immobilized on polydopamine-coated magnetite nanoparticles for biodiesel production from soybean oil. **Biofuel Research Journal**, v. 3, n. 2, p. 403-409, 2016.

BARBOSA, O. et. al. Versatility of glutaraldehyde to immobilize lipases: Effects of the immobilization protocol on the properties of lipase B from *Candida antarctica*. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 8, p. 1220-1227, 2012.

BARRETO, A. et. al. Novel Ferrofluids coated with a renewable material obtained from cashew nut shell liquid. **Microfluidics and nanofluidics**, p. 1-10, 2012.

BORNSCHEURER, U. T. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. **FEMS Microbiology reviews**, v. 26, p. 73-81, 2002.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRZOZOWSKI, A. M. et al. Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. **Biochemistry**, v. 39, n. 49, p. 15071-15082, 2000.

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

CHOI, E. J. et al. Mossbauer study in zinc ferrite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 301 p. 171-174, 2006.

DALLA-VECHIA, R. et. al. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 623-630, 2004.

Definition of a nanomaterial, European Commission. Disponível em:  
<[http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition\\_en.htm](http://ec.europa.eu/environment/chemicals/nanotech/faq/definition_en.htm)>.  
Acesso em: 12 set. 2015.

EDERMOGLU, M., SARIKAYA, M. Effects of heavy metal oxalates on the zeta potential of magnetite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 300, p. 795-804, 2006

FARAJI, M., YAMINI, Y., REZAEI, M. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Functionalization, Characterization, and Applications. **Journal of the Iranian Chemical Society**, v. 7, n. 1, p. 1-37, 2010.

FERNÁNDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 62, n. 3-4, p. 197-212, 2010.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et al. Glutaraldehyde cross-linking of lipases adsorbed on aminated supports in the presence of detergents leads to improved performance. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 9, p. 2610-2615, 2006.

FERNÁNDEZ-LORENTE, G. et. al. Specificity enhancement towards hydrophobic substrates by immobilization of lipases by interfacial activation on hydrophobic supports. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, n. 5, p. 565-569, 2007.

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

GHASEMI, S.; HEIDARY, M.; FARAMARZI, M. A.; HABIBI, Z. Immobilization of lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/ZnO core/shell magnetic nanoparticles and catalysis of Michael-type addition to chalcone derivatives. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 100, p. 121-128, 2014.

GUISAN, J. M. et al. Immobilization of Enzymes Acting on Macromolecular Substrates: Reduction of Steric Problems. In: **Immobilization of Enzymes and Cells**. New Jersey: Humana Press, 1998. v. 60p. 261-276.

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

HE, F.; ZHANG, S.; LIU, X. Immobilization of feruloyl esterases on magnetic nanoparticles and its potential in production of ferulic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 120, p. 330-334, 2015.

JAEGER, K. E.; REETZ, M. T. Microbial lipases from versatile tools for biotechnology. **Trends in biotechnology**, v. 16, n. 9, p. 396-403, 1998.

JIANG, Y. et al. Magnetic nanoparticles supported ionic liquids for lipase immobilization: Enzyme activity in catalyzing esterification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 58, n. 1-4, p. 103-109, 2009.

JIN, Y. et. al. Efficient bacterial capture with amino acid modified magnetic nanoparticles. **Water Research**, v. 50, p. 124-134, 2014.

LAURENT, S. et. al. Magnetic Iron Oxide Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Vectorization, Physicochemical Characterizations, and Biological Applications. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 2064-2110, 2008.

LEE, D. et. al. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of molecular catalysis B: Enzymatic**, v. 57, p. 62-66, 2009.

LIU, X. et al. Immobilization of lipase onto micron-size magnetic beads. **Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences**, v. 822, n. 1-2, p. 91-7, 2005.

MATEO, C. et. al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, p. 1451-1463, 2007.

MOORE, S.; STEIN, W. H. Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. **Journal of Biological Chemistry**, v.176, p.367-388, 1948.

MOORE, S.; STEIN, W. H. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. **Journal of Biological Chemistry**, v.211, p.907-913, 1954.

NAGARAJAN, R. Nanoparticles: Building Blocks for Nanotechnology. In: [s.l: s.n.]. p. 2-14.

NAMDEO, M.; BAJPAI, S. K. Immobilization of  $\alpha$ -amylase onto cellulose-coated magnetite (CCM) nanoparticles and preliminary starch degradation study. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 59, p. 134-139, 2009.

PALLA, C. A. et. al. Preparation and modification of chitosan particles for *Rhizomucor miehei* lipase immobilization. **Biochemical Engineering Journal**, v. 55, n. 3, p. 199-207, 2011.

PALOMO, J. M. et. al. Lipase-lipase interactions as a new tool to immobilize and modulate the lipase properties. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 36, n. 4, p. 447-454, 2005.

PARK, J. Y. et. al. Colloidal stability of amino acid coated magnetite nanoparticles in physiological fluid. **Materials Letters**, v. 63, p. 379-381, 2009.

PATEL, D. et. al. Amino acid functionalized magnetite nanoparticles in saline solution. **Current Applied Physics**, v. 9, p. 32-34, 2009.

RAITA, M.;et. al. Modification of magnetic nanoparticle lipase designs for biodiesel production from palm oil. **Fuel Processing Technology**. p. 1-9, 2015.

RANJBAKSH, E. et. al. Enhancement of stability and activity on immobilized lipase on sílica-coated modified magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 179, p. 272-276, 2012.

REBELO, L. P. et al. Enzymatic kinetic resolution of (RS)-1-(phenyl)ethanols by *Burkholderia cepacia* lipase immobilized on magnetic nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 8, p. 1537-1542, 2010.

REHM, S.; TRODLER, P.; PLEISS, J. Solvent-induced lid opening in lipases: A molecular dynamics study. **Protein Science**, v. 19, n. 11, p. 2122-2130, 2010.

REN, Y. et al. Facile, high efficiency immobilization of lipase enzyme on magnetic iron oxide nanoparticles via a biomimetic coating. **BMC biotechnology**, v. 11, n. 1, p. 63, 2011.

RIBEIRO, G. A. P. As propriedades magnéticas da matéria: Um primeiro contato. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, p. 299-305, 2000.

RODDICK-LANZILOTTA, A. D.; MCQUILLAN, A. J. An in situ Infrared Spectroscopic Study of Glutamic Acid and of Aspartic Acid Adsorbed on TiO<sub>2</sub>: Implications for the Biocompatibility of Titanium. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 227, p. 48–54, 2000.

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

SHAW, S.; CHEN, Y.; OU, J.; HO, L. Preparation and characterization os *Pseudomonas putida* esterase immobilized on magnetite nanoparticles. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 5, p. 1089-1095, 2006.

SHULER, M. L.; KARGI, F. **Bioprocess Engineering: Basic Concepts**. 2.ed. Prentice Hall, 2002.

SILVA, J. A. et. al. Immobilization of *Candida antártica* lipase B by covalent attachment on chitosan-based hydrogels using different support activation strategies. **Biochemical Engineering Journal**, v.60, p.16-24, 2012.

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

SOUZA, M. S. M. **Imobilização de lipase de *Candida antártica* do tipo B em nanopartículas magnéticas visando a aplicação na síntese de ésteres**. 2013. 87 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

SUI, Y. et. al. Surface modification of magnetite nanoparticles using gluconic acid and their application in immobilized lipase. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 93, p. 24-28, 2012.

SUN, S. et. al. Efficiency improvements on ninhydrin method for amino acid quantification. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p.112-117, 2006.

TIE, S. L. et. al. Amino acid-coated nano-sized magnetite particles prepared by a two-step transformation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.273, n.1-3, p.75-83, fev. 2006.

TORRES, R. et. al. Improvement of the enantioselectivity of lipase (fraction B) from *Candida antarctica* via a adsorption polyethylenimine-agarose under different experimental conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v.39, n.2, p.167-171, 2006

TRAN, D. et. al. Immobilization of *Burkholderia* sp. lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 112-119, 2012.

TUDORACHE, M. et. al. Biocatalytic alternative for bio-glycerol conversion with alkyl carbonates via a lipase-linked magnetic nano-particles assisted process. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 145, p. 120-125, 2014

UNAL, B. et. al. L-Histidine coated iron oxide nanoparticles: Synthesis, structural and conductivity characterization. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 505, p. 172-178, 2010.

VIEIRA, A. P et. al. Adsorption of Cysteine on Hematite, Magnetite and Ferrihydrite: FT-IR, Mössbauer, EPR Spectroscopy and X-ray Diffractometry Studies. **Amino acids**, v. 40, p. 205–214, 2011.

VILLENEUVE, P. et. al. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v.9, n. 4-6, p.113-148, abr. 2000.

WANG, J. H. et. al. Amino-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub> core-shell magnetic nanomaterial as a novel adsorbent for aqueous heavy metals removal. **Journal of Colloid Interface Science**, v. 349, p. 293-299, 2010.

WILLARD, M. A. et. al. Chemically prepared magnetic nanoparticles. **International Material Reviews**, v. 49, n. 3-4, p. 125-170, 2004.

XIE, W.; MA, N. Immobilized lipase on Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Energy & Fuels**, v. 23, n. 3, p. 1347-1353, 2009.

YONG, Y. et. al. Characterization of *Candida rugosa* lipase immobilized onto magnetic microspheres with hydrophilicity. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 11, p 1179-1185, 2008.

ZHAO, S.; ASUHA, S. One-pot synthesis of magnetite nanopowder and their magnetic properties. **Powder Technology**, v. 197, p. 295-297, 2010.