

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA  
DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA  
QUÍMICA

ROSANA OLIVEIRA HENRIQUES

**Desenvolvimento de Metodologias para a Imobilização e  
Coimobilização de Enzimas em Nanopartículas Magnéticas**

FLORIANÓPOLIS  
2016



ROSANA OLIVEIRA HENRIQUES

**Desenvolvimento de Metodologias para a Imobilização e  
Coimobilização de Enzimas em Nanopartículas Magnéticas**

Tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia Química, na Área de Concentração de Desenvolvimento de Processos Químicos e Biotecnológicos.

Aluna: Rosana Oliveira Henriques

Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Junior

Coorientador: Dr. Benevides Costa Pessela João

FLORIANÓPOLIS

2016

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

Henriques, Rosana Oliveira

Desenvolvimento de metodologias para a imobilização e  
coimobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas /  
Rosana Oliveira Henriques ; orientador, Agenor Furigo  
Junior ; coorientador, Benevides Costa Pessela João. -  
Florianópolis, SC, 2016.

175 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Química. 2. Imobilização e coimobilização de  
enzimas. 3. Nanopartículas magnéticas . 4. Biocatálise .  
I. Furigo Junior, Agenor. II. Pessela João, Benevides  
Costa. III. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. IV. Título.

*“Your theory is crazy, but it's  
not crazy enough to be true.”*

*Niels Bohr*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu pai, Luiz Roberto, e minha irmã, Marília, pelo amor incondicional e por estarem sempre presentes, incentivando, acreditando e sonhando juntos;

Ao Prof. Agenor, meu orientador, por compartilhar seu conhecimento, pelo apoio, paciência e amizade;

Ao Dr. Benevides, meu coorientador, por me receber de forma tão acolhedora em seu laboratório em Madrid, por todos os ensinamentos passados e pela amizade;

A Dra. Glória Fernandez por toda a sua disponibilidade, troca de conhecimentos e gentileza durante minha estadia em Madrid;

Ao Dr. José Manuel Guisán, por todas as discussões, ensinamentos e contribuições especiais para o desenvolvimento deste trabalho;

A todos os colegas, professores e funcionários do ENGEBIO, pelos bons momentos compartilhados ao longo desta caminhada, por me ajudarem sempre que necessário e pela amizade;

Aos meus colegas de grupo de pesquisa, Jonathan, Bruno, Fernanda; e os estagiários Martha, Lucas, Valquíria e Gabriel, um muito obrigado especial. Vocês foram fundamentais no desenvolvimento deste trabalho, sem vocês não seria possível.

Aos queridos amigos do CIAL e ICP, Eliane, Lívia, Daniela, Marylane, Sonia, Junior, Cesar, Kamilly e Paz, pelos ótimos momentos passados juntos em Madrid, por todos os almoços, aventuras e risadas. Foi um prazer dividir esta experiência com vocês.

A todos os meus amigos, professores e pessoas que, de alguma forma, fizeram parte desta jornada, tanto participando de momentos de descontração e amizade, quanto contribuindo no andamento de minha pesquisa. Cada um de vocês teve um papel importante nesta jornada.

A CAPES e ao CNPq pelo auxílio financeiro;

Ao LCME pelas análises de microscopia eletrônica;

Ao Departamento de Engenharia Química e Alimentos da UFSC e ao *Instituto de Investigación en Ciencias de La Alimentación* do CSIC-Madrid, pela estrutura e apoio necessários para o desenvolvimento desta pesquisa.



## RESUMO

Nanopartículas magnéticas como a magnetita (NPM) são materiais amplamente empregados na área de biotecnologia, incluindo a aplicação como suportes para a imobilização de enzimas. Neste trabalho foram sintetizadas NPMs modificadas superficialmente com lauril sulfato de sódio (SDS) através da coprecipitação dos íons de  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  em duas etapas, sendo a primeira a precipitação da NPM com oxalato de amônio, seguida da substituição do ânion dicarboxílico do oxalato por SDS (NPM-SDS). As NPM-SDS foram caracterizadas através de difração de raios-x, espectroscopia de absorção no infravermelho por transformada de Fourier, microscopia de transmissão eletrônica, microscopia eletrônica de varredura, magnetização da amostra vibrante e determinação do potencial zeta. As NPM-SDS foram aplicadas como suporte para a imobilização e coimobilização de enzimas através dos métodos de adsorção, ligação covalente e entrecruzamento de ligações. A estratégia abordada de forma inédita baseou-se na adsorção da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) na NPM-SDS seguido da modificação química dos grupos carboxílicos superficiais da TLL com etilenodiamina pelo método de acoplamento com 1-etil-3-(dimetilaminopropil) carbodiimida. Na segunda etapa o derivado aminado foi aplicado na coimobilização das enzimas  $\beta$ -D-galactosidase de *Kluyveromyces lactis* ( $\beta$ Gal) através de adsorção e entrecruzamento de ligações com dextrano-aldeído e glutaraldeído. O derivado com a lipase aminada foi modificado com dextrano-aldeído e glutaraldeído e aplicados, na coimobilização da TLL e da  $\alpha$ -quimotripsina de pâncreas bovino (QM) através de adsorção, ligação covalente e entrecruzamento de ligações com glutaraldeído. Todos os derivados coimobilizados apresentaram uma estabilidade operacional superior às enzimas na sua forma livre, frente às temperaturas e faixa de pH estudadas, com a TLL ativa mesmo após a desnaturação térmica das demais enzimas coimobilizadas. Os derivados mais estáveis foram obtidos com a TLL/ $\beta$ Gal coimobilizadas e entrecruzadas com glutaraldeído 0,5% (v/v) e da TLL/QM coimobilizadas no suporte aminado por adsorção iônica. A  $\beta$ Gal coimobilizada suportou temperaturas de até 80 °C restando 56 % da atividade inicial após 13 h de incubação, enquanto a  $\beta$ Gal livre perdeu mais de 50 % de sua atividade após 2 h à 30°C. Já a QM teve a estabilidade térmica aumentada após a coimobilização, sendo estável à 50 °C com mais de 80 % de atividade recuperada, comparada com a enzima livre estável apenas até 30 °C.

**Palavras-Chave:** nanopartículas magnéticas, magnetita, imobilização, coimobilização, lipases,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\alpha$ -quimotripsina.



## ABSTRACT

Magnetic nanoparticles, such as magnetite (NPM), are widely used in biotechnology, including support for enzyme immobilization. In the present work NPM surface-modified with sodium lauryl sulfate (SDS) were synthesized by co-precipitation of  $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  ions. The methodology was carried in two steps, first, the precipitation of the NPM with ammonium oxalate, followed by the replacement of dicarboxylic anions, from oxalate, for lauryl sulfate groups (NPM SDS). The NPM-SDS were characterized by X-ray diffraction, Fourier transform infrared spectroscopy, transmission electron microscopy, scanning electron microscopy, magnetization of vibrating sample, and determination of the zeta potential. NPM-SDS nanoparticles were applied as support for the immobilization and co-immobilization of enzymes through adsorption, covalent, and cross-linking methods. The adopted strategy based on the adsorption of lipases present in *Thermomyces lanuginosus* (TLL) onto NPM-SDS, followed by, chemical amination of surface carboxylic groups from TLL with ethylenediamine by 1-ethyl-3-(dimethylamino-propyl) carbodiimide coupling method. Subsequently, the aminated derivative was applied on the co-immobilization of  $\beta$ -D-galactosidase from *Kluyveromyces lactis* ( $\beta$ Gal), by adsorption and cross-linking with dextran-aldehyde and glutaraldehyde. The aminated derivative, with the modified lipase, was also modified with dextran-aldehyde and glutaraldehyde, thereafter, applied on the co-immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin from bovine pancreas (QM) by adsorption, covalent bonding, and cross-linking with glutaraldehyde. All immobilization mechanism generated co-immobilized derivative with higher operational stability, when compared with the free enzyme, according temperatures and pH range studied. The TLL remained active after the thermal inactivation of  $\beta$ Gal and QM co-immobilized. The most stable derivative was obtained by the co-immobilized preparations of TLL/ $\beta$ Gal cross-linked with 0.5% glutaraldehyde (v / v), and TLL/ QM co-immobilized directly onto the aminated derivative by ionic adsorption. The co-immobilized  $\beta$ Gal remained stable at temperatures up to 80 °C, retaining 56 % of the initial activity after 13 h of incubation, while the free  $\beta$ Gal lost more than 50% of its activity after 2 h at 30 °C. The QM increased the thermal stability after the co-immobilization, and may be applied at temperature of 50 °C with more than 80 % recovered activity, compared with the free enzyme that was stable only up to 30 °C.

**Keywords:** magnetic nanoparticles, magnetite, immobilization, co-immobilization, lipases,  $\beta$ -D-galactosidase,  $\alpha$ -chymotrypsin.



## LISTA DE SÍMBOLOS

$\sigma$	Coefficiente angular da reta [1/min]
$\alpha$	Parâmetro de rede [nm]
$A_f$	Atividade enzimática específica no derivado enzimático, ao final da imobilização [U/g]
$A_i$	Atividade enzimática total no sobrenadante, oferecida inicialmente [U/g]
$A_R$	Atividade recuperada [%]
$A_t$	Atividade enzimática total no sobrenadante, ao final da imobilização [U/mL]
$c$	Caminho ótico [cm]
CM	Capacidade máximas de proteínas adsorvida [mg/g suporte]
$d_{hkl}$	Distância interplanar
Hc	Coercividade [kOe]
Mr	Magnetização remanente [emu/g]
Ms	Magnetização de saturação [emu/g]
$n$	Ordem de difração
P	Concentração de proteínas em solução [mg/mL]
$P_I$	Massa de proteína imobilizada [mg]
$P_T$	Massa total de proteínas [mg]
RI	Rendimento da imobilização [%]
$V_{amostra}$	Volume do derivado enzimático [mL]
$V_{final}$	Volume final total do meio reacional [mL]
$\theta$	Ângulo do feixe do Raio-X incidente
$\lambda$	Comprimento de onda [nm]
$\epsilon$	Coefficiente de extinção molar [1/( $\mu\text{mol cm}$ )]



## LISTA DE ABREVIÇÕES

APTS	3-aminopropiltrimetoxisilano
Asp	Ácido aspártico
BET	Brunauer, Emmett e Taller
BJH	Barrett, Joyner e Halenda
BTNA	N-benzoil-L-tirosina-paranitroanilida
CALB	Lipase B de <i>Candida antarctica</i>
CLEA	<i>Cross-linked enzyme aggregate</i>
CNBr	Suporte comercial Sepharose 4CL ativado com brometo de cianogênio
CNBr-QM	Derivado enzimático com a $\alpha$ -quimotripsina imobilizada em CNBr
CNBr-TLL	Derivado enzimático com a lipase imobilizada em CNBr
CNBr- $\beta$ Gal	Derivado enzimático com a $\beta$ -D-galactosidase imobilizada CNBr
CTAB	Brometo de cetil trimetil amônio
DRX	Difratometria de Raios-X
DTGS	Detector de sulfato de triglicina deuterada
DVB	Divinilbenzeno
EDA	1,2-etilenodiamina
EDC	1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida
EGDMA	Dimetacrilato de etilenglicol
FTIR	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier
Glu	Ácido gultâmico
GMA	Glicidil metacrilato
HEMA-DMDAAC	Metacrilato de hidroxietila-co-cloreto de dimetilamonia;
His	Histidina
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
MAV	Magnetização de amostra vibrante
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MMA	Ácido metacrílico
MS	Monolaurato de sacarose
NPM-TLLA	Derivado enzimático com a lipase aminada

NPM-TLLA-QM	Derivado enzimático com a lipase aminada e a $\alpha$ -quimotripsina coimobilizada
NPM-TLLA-QMG	Derivado enzimático com a lipase aminada e a $\alpha$ -quimotripsina coimobilizada entrecruzado com glutaraldeído
NPM-TLLD	Derivado enzimático com a lipase modificada com dextrano-aldeído
NPM-TLLD-QM	Derivado enzimático com a lipase modificada com dextrano-aldeído e a $\alpha$ -quimotripsina coimobilizada
NPM-TLLG	Derivado enzimático com a lipase modificada com glutaraldeído
NPM-TLLG-QM	Derivado enzimático com a lipase modificada com dextrano-aldeído e a $\alpha$ -quimotripsina coimobilizada
NPM-TLL- $\beta$ Gal	Derivado enzimático com a lipase aminada e a $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas
NPM-TLL- $\beta$ GalD	Derivado enzimático com a lipase e a $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas e entrecruzadas com dextrano-aldeído
NPM-TLL- $\beta$ GalG05	Derivado enzimático com a lipase e a $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas e entrecruzadas com glutaraldeído 0,5%
NPM-TLL- $\beta$ GalG1	Derivado enzimático com a lipase e a $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas e entrecruzadas com glutaraldeído 1,0%
NSM-OX	Nanopartículas de magnetita funcionalizadas com oxalato
NSM-SDS	Nanopartículas de magnetita funcionalizadas com lauril sulfato de sódio
<i>o</i> -NP	<i>o</i> -nitrofenolato
<i>o</i> -NPG	<i>o</i> -nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosideo
OTES	Octiltrióxosilano
PBS	Solução tampão fosfato de sódio
PEI	Polietilenoamina
PMA	Metacrilato de metila
<i>p</i> -NP	<i>p</i> -Nitrofenol
<i>p</i> -NPB	Butirato de <i>p</i> -nitrofenila
QM	$\alpha$ -Quimotripsina
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
Ser	Serina

TEOS	Ortossilicato de tetraetila
TLL	Lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i>
UV/VIS	Ultravioleta na região visível;
VA	Acetato de vinila
βGal	β-D-galactosidase



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Diagrama conceitual da tese. ....	29
Figura 2- Organograma do documento de tese.....	31
Figura 3- Reações catalisadas por lipases .....	38
Figura 4- Representação tridimensional da estrutura cristalina da lipase de <i>Thermomyces lanuginosus</i> com a tampa (vermelho) na forma aberta (à esquerda) e fechada (à direita), o sítio ativo (verde) e uma região flexível composta por aminoácidos (azul).....	40
Figura 5- Reações de conversão pela enzima $\beta$ -D-galactosidase. ....	41
Figura 6- Reação de hidrólise de uma proteína catalisada pela quimotripsina.....	43
Figura 7- Métodos de imobilização de enzimas. ....	46
Figura 8- Evolução do número de publicações relacionadas à imobilização de enzimas em NPM nos últimos quinze anos.....	49
Figura 9- Resumo dos diferentes materiais utilizados na obtenção de NPs, morfologias, modificações estruturais, meios e estados de dispersão.....	50
Figura 10- Representação da orientação dos momentos magnéticos em materiais com diferentes comportamentos magnéticos.....	51
Figura 11- Ciclo de histerese de um material magnético com características ferromagnéticas.....	52
Figura 12- Mecanismo proposto para a reação de síntese da NPM-SDS em duas etapas.....	74
Figura 13- Nanopartículas hidrofóbicas de magnetita (NPM-SDS) em suspensão (a) e sob a aplicação de um campo magnético (b). ....	79
Figura 14- Imagens de MET (a-b) e MEV (c-d) obtidas das nanopartículas NPM-SDS. ....	80
Figura 15- Difractograma de Raio-X para a magnetita pura (NPM), com oxalato (NPM-OX) e modificada com SDS (NPM-SDS), destacando os picos de difração em cada amostra. ....	81
Figura 16- Espectro de FTIR das partículas de NPM-OX (magnetita funcionalizada com oxalato) e NPM-SDS (magnetita modificada com SDS). ....	82
Figura 17- Curva de magnetização NPM-SDS, com campo magnético de 20 kOe. ....	83
Figura 18- Isotermas de adsorção e dessorção de $N_2$ para as partículas NPM-SDS .....	84
Figura 19- Curva de titulação do potencial zeta das nanopartículas de magnetita, sem modificações (NPM), funcionalizada com oxalato de	

amônio (NPM-OX) e funcionalizada com lauril sulfato de sódio (NPM-SDS).....	85
Figura 20- Rendimento da imobilização da lipase TLL no suporte NPM-SDS, utilizando concentração de proteínas de $1,83 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$ , para g de suporte, em temperatura ambiente.....	94
Figura 21- Rendimento de imobilização da TLL em NPM-SDS mediante diferentes valores de força iônica, utilizando NaCl, KCl, $\text{CaCl}_2$ 0,1% (m/v); tampão fosfato de sódio (PBS) 25mM e tampão fosfato de sódio com NaCl (PBS+NaCl, 25mM + 0,1%), durante 60 min de incubação e temperatura ambiente. Os valores ao lado de cada curva indicam a força iônica para cada solução.....	97
Figura 22- Rendimento de imobilização da TLL em NPM-SDS com diferentes concentrações de NaCl durante 30 min de incubação. ....	98
Figura 23- Comparação da estabilidade térmica dos derivados NPM-TLL e CNBr-TLL nas temperaturas de 60, 70 e 80°C, em pH 7,0 e tempo de 8 h.....	100
Figura 24- Estabilidade do derivado NPM-TLL em soluções tampão com pH 4,7 e 9, e temperatura ambiente e tempo de análise de 24 h. ....	101
Figura 25- Atividade relativa do derivado NPM-TLL em diferentes valores de pH, onde o pH 7,0 é definido como 100% de atividade relativa. ....	102
Figura 26- Aminoação química dos grupos carboxílicos de uma proteína ativados com EDC na presença de EDA.....	106
Figura 27- Esquema da estratégia de modificação dos grupos carboxílicos da TLL através da aminoação química em fase sólida do derivado NPM-TLL, com etilenodiamina (EDA), 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), e posterior coimobilização da $\beta$ -D-Galactosidase.....	107
Figura 28- Espectrograma obtido por FTIR-ATR do suporte NPM-SDS e dos derivados NPM-TLL e NPM-TLLA (a), destacando a região entre $500\text{-}1750 \text{ cm}^{-1}$ (b). ....	114
Figura 29- Rendimento de imobilização da $\beta$ -D-galactosidase no suporte NPM-TLLA, utilizando concentração de 1 mL $\beta$ -Gal e 1 g NPM-SDS-1 ( $0,25 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$ ), em temperatura ambiente. ....	116
Figura 30- Comparação da estabilidade térmica do derivado NPM- $\beta$ Gal e CNBr- $\beta$ Gal em pH 7,0, temperaturas de 30, 40 e 50°C, durante 8h de reação. ....	119
Figura 31- Estabilidade térmica das enzimas TLL e $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas no derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal, em pH 7,0 nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, durante 8 h de reação. ....	119

Figura 32- Comparação da estabilidade dos derivados NPM-TLL- $\beta$ Gal e CNBr- $\beta$ Gal em diferentes valores de pH. ....	120
Figura 33- SDS-PAGE dos derivados coimobilizados de TLL e $\beta$ -D-Galactosidase, onde: P) é o padrão de proteínas, a) TLL livre, b) NPM-TLL, c) $\beta$ Gal livre, d) NPM-TLL- $\beta$ Gal, e) NPM-TLL- $\beta$ GalD, f)NPM-TLL- $\beta$ GalG05 e g) NPM-TLL- $\beta$ GalG1.....	122
Figura 34- Comparação da estabilidade térmica das enzimas TLL e $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas nos derivados NPM- $\beta$ Gal-Glu05, NPM- $\beta$ Gal-Glu1.0 e NPM-TLL- $\beta$ GalD, em pH 7,0, temperaturas de 60, 70 e 80°C, durante 14 h de reação. ....	124
Figura 35- Comparação da estabilidade dos derivados coimobilizados entrecruzados em diferentes.....	126
Figura 36- Esquema das metodologias aplicadas na coimobilização da TLL e QM, onde 1) é a coimobilização a QM no derivado NPM-TLLA e o entrecruzamento do derivado coimobilizado com glutaraldeído; 2) é a modificação do derivado NPM-TLLA com dextrano-aldeído e a coimobilização da QM; e 3) é a ativação do derivado NPM-TLLA com glutaraldeído e a coimobilização da QM.....	131
Figura 37- SDS-PAGE dos derivados coimobilizados de TLL e quimotripsina, onde: P) é o padrão de proteínas; a) a TLL livre, b) o NPM-TLL, c) a QM livre, d) o NPM-TLLA- QM, e) o NPM-TLLG10-QM e f) o NPM-TLLG15-QM e g) o NPM-TLLD-QM. ....	137
Figura 38- Estabilidade térmica do derivado CNBr-QM na faixa de temperatura de 30-50°C, durante 5h de incubação.....	139
Figura 39- Estabilidade térmica das enzimas TLL e QM nos derivados coimobilizados, após 5h de incubação a 50°C. ....	140
Figura 40- Estabilidade da enzima QM nos derivados coimobilizados, ao longo de 5h de incubação em diferentes valores de pH.....	142
Figura 41- Estabilidade da enzima QM nos derivado coimobilizado entrecruzado com glutaraldeído 0,5%, ao longo de 5h de incubação em diferentes valores de pH.....	143



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Publicações aplicando micro e nanopartículas de magnetita para a imobilização de lipases. ....	58
Tabela 2- Publicações aplicando nanopartículas magnéticas para a imobilização de $\beta$ -D-galactosidases. ....	66
Tabela 3- Publicações aplicando nanopartículas magnéticas para a imobilização de $\alpha$ -quimotripsinas. ....	68
Tabela 4- Características porosas da NPM-SDS através dos métodos BET e BJH. ....	84
Tabela 5- Carga máxima de proteína adsorvida no suporte NPM-SDS, mediante diferentes concentrações de TLL. Condições experimentais: temperatura ambiente, 1h, pH 7,0. ....	95
Tabela 6 - Dessorção da TLL do suporte NPM-SDS utilizando soluções de detergente (CTAB e LC) e soluções iônicas (NaCl) em diferentes concentrações. ....	99
Tabela 7- Atividade específica e recuperada da TLL antes e depois da aminação química com EDA. ....	115
Tabela 8- Carga máxima de proteína adsorvida no derivado aminado NPM-TLLA, mediante diferentes concentrações de $\beta$ Gal. Condições experimentais: temperatura ambiente, 1h, pH 7,0. ....	116
Tabela 9- Atividade específica e recuperada das enzimas TLL e $\beta$ Gal nos derivados coimobilizados e entrecruzados. ....	121
Tabela 10- Atividade relativa da TLL e $\beta$ Gal livres e coimobilizadas nos derivados, ao final de 8h de incubação em temperaturas de 50 e 60°C. ....	123
Tabela 11- Atividade específica, rendimento de imobilização e atividade recuperada das enzimas TLL e QM nos derivados coimobilizados. ...	136



## SUMÁRIO

<b>DIAGRAMA CONCEITUAL DA TESE .....</b>	<b>29</b>
<b>ORGANOGRAMA DO DOCUMENTO DE TESE .....</b>	<b>31</b>
<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>33</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>37</b>
2.1 APLICAÇÃO DE ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES .....	37
2.1.1 Lipases.....	38
2.1.2 $\beta$ -D-galactosidasas .....	40
2.1.3 $\alpha$ - Quimotripsina .....	43
2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS .....	44
2.2.1 Métodos de Imobilização de Enzimas .....	45
2.2.2 Nanopartículas Magnéticas Aplicadas como Suporte para a Imobilização Enzimática .....	48
2.2.2.1 Nanopartículas Magnéticas .....	49
2.2.2.2 Propriedades Magnéticas.....	50
2.2.2.3 Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Ferro .....	53
2.2.2.4 Métodos de Estabilização e Funcionalização de Nanopartículas Magnéticas .....	56
2.2.3 Imobilização de Lipases em NPM.....	57
2.2.4 Imobilização de $\beta$ -D- galactosidase em NPM.....	64
2.2.5 Imobilização de $\alpha$ -Quimotripsinas em NPM.....	67
2.3 COIMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS.....	70
<b>3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA HIDROFÓBICAS.....</b>	<b>73</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	73
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	74
3.2 MATERIAS E MÉTODOS .....	75
3.2.1 Materiais.....	75
3.2.2 Métodos.....	75
3.2.2.1 Síntese das Partículas de Magnetita Funcionalizadas com SDS (NPM-SDS):.....	75
3.2.2.2 Análise Estrutural e Morfológica .....	76
3.2.2.3 Determinação dos Parâmetros Microestruturais.....	76
3.2.2.4 Determinação da composição química .....	77
3.2.2.5 Determinação das propriedades magnéticas.....	77
3.2.2.6 Determinação da área superficial, diâmetro e volume dos poros .....	78

3.2.2.8	Determinação do potencial zeta das nanopartículas NPM-SDS	78
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	79
3.3.1	Síntese da NPM-SDS	79
3.3.2	Caracterização Físico-Química das NPM-SDS	80
3.4	CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
<b>4</b>	<b>IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL) NO SUPORTE NPM-SDS</b>	<b>89</b>
4.1	INTRODUÇÃO	89
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	89
4.3	MATERIAIS E MÉTODOS	89
4.3.1	Materiais	89
4.3.2	Métodos	90
4.3.2.1	Imobilização da lipase de TLL no suporte NPM-SDS	90
4.3.2.2	Imobilização da TLL no suporte CNBr	90
4.3.2.3	Determinação da atividade hidrolítica do derivado NPM-TLL	91
4.3.2.4	Determinação do teor de proteínas no preparado enzimático comercial de TLL	93
4.3.2.5	Ensaio de termoestabilidade do derivado enzimático	93
4.3.2.6	Ensaio de estabilidade da lipase imobilizada frente a diferentes pHs	93
4.3.2.7	Determinação do pH ótimo do derivado NPM-TLL	93
4.3.2.8	Ensaio de dessorção da lipase do derivado NPM-TLL	94
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	94
4.4.1	Imobilização da Lipase TLL no Suporte NPM-SDS	94
4.4.2	Avaliação da Força de Interação Entre Enzima-Suporte	98
4.4.3	Estabilidade Térmica do Derivado NPM-TLL	99
4.4.3	Estabilidade Frente a Diferentes pHs e pH Ótimo	100
4.5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	102
<b>5</b>	<b>MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO DERIVADO ENZIMÁTICO NPM-TLL E COIMOBILIZAÇÃO DA <math>\beta</math>-D-GALACTOSIDASE</b>	<b>105</b>
5.1	INTRODUÇÃO	105
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	108
5.3	MATERIAIS E MÉTODOS	109
5.3.1	Materiais	109
5.3.2	Métodos	109
5.3.2.1	Aminação Química do Derivado NPM-TLL	109

5.3.2.2 Coimobilização da $\beta$ -D-galactosidase no Derivado Aminado NPM-TLLA.....	109
5.3.2.3 Entrecruzamento do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal com glutaraldeído.....	110
5.3.2.4 Entrecruzamento do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal com dextranaldeído.....	110
5.3.2.5 Imobilização da $\beta$ -D-galactosidase em suporte comercial CNBr.....	111
5.3.2.6 Determinação da atividade hidrolítica dos derivados enzimáticos.....	111
5.3.2.7 Determinação do Teor de Proteínas no Preparado Enzimático de $\beta$ -D-galactosidase.....	111
5.3.2.8. Ensaio de Termoestabilidade do Derivado Enzimático.....	111
5.3.2.9 Ensaio de estabilidade dos derivados enzimáticos frente a diferentes pHs.....	112
5.3.2.10 Ensaio de Dessorção da $\beta$ -D-Galactosidase.....	112
5.3.2.11 Identificação das Proteínas Coimobilizadas e Confirmação do Mecanismo de Imobilização.....	112
<b>5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	113
5.4.1 Aminoação Química do Derivado NPM-TLLA.....	113
5.4.2 Coimobilização da $\beta$ -D-galactosidase no derivado NPM-TLLA.....	115
5.4.3 Caracterização do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal.....	117
5.4.3.1 Estabilidade Térmica do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal.....	117
5.4.3.2 Estabilidade do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal em diferentes valores de pH.....	120
5.4.4. Entrecruzamento de ligações do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal.....	120
5.4.4.1 Estabilidade térmica dos derivados entrecruzados.....	122
5.4.4.2 Estabilidade dos derivados entrecruzados em relação a diferentes valores de pH.....	125
<b>5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	126
<b>6 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO DERIVADO ENZIMÁTICO NPM-TLL E COIMOBILIZAÇÃO DA <math>\alpha</math>-QUIMOTRIPSINA....</b>	<b>129</b>
6.1 INTRODUÇÃO .....	129
6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	132
6.3 MATERIAIS E MÉTODOS .....	132
6.3.1 Materiais.....	132
6.3.2 Métodos.....	132
6.3.2.1 Coimobilização da $\alpha$ -Quimotripsina no Derivado NPM-TLL e NPM-TLLA.....	132

6.3.2.2 Modificação do Derivado NPM-TLLA com Dextrano-aldeído e Coimobilização da $\alpha$ -Quimotripsina .....	133
6.3.2.3 Ativação do Derivado NPM-TLLA com Glutaraldeído e Coimobilização da $\alpha$ -Quimotripsina .....	133
6.3.2.4 Entrecruzamento do Derivado Coimobilizado NPM-TLLA-QM .....	133
6.3.2.5 Imobilização da $\alpha$ -Quimotripsina em Suporte Comercial CNBr .....	134
6.3.2.6 Determinação da Atividade Hidrolítica da $\alpha$ -Quimotripsina ..	134
6.3.2.7 Determinação do Teor de Proteínas no Preparado Enzimático de $\alpha$ -Quimotripsina .....	134
6.3.2.8. Ensaio de Termoestabilidade do Derivado Enzimático .....	134
6.3.2.9 Ensaio de Estabilidade dos Derivados Enzimáticos Frente a Diferentes pHs .....	135
6.3.2.10 Ensaio de Dessorção da $\alpha$ -Quimotripsina .....	135
6.3.2.11 Identificação das Proteínas Coimobilizadas e Determinação do Mecanismo de Imobilização .....	135
6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	135
6.4.1 Coimobilização da QM nos Suportes Derivatizados da NPM-TLLA .....	135
6.4.2 Estabilidade Térmica dos Derivados Coimobilizados.....	138
6.4.5 Estabilidade dos Derivados Coimobilizados em Diferentes Valores de pH.....	141
6.4.6 Entrecruzamento do Derivado NPM-TLLA-QM com Glutaraldeído.....	142
6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	143
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>145</b>
<b>8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>147</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>149</b>
<b>APÊNDICE I- ANÁLISE DO DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA AMOSTRA NPM-SDS.....</b>	<b>165</b>
<b>ANEXO I - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO DE N<sub>2</sub> – MÉTODO BET E BJH.....</b>	<b>167</b>
<b>ANEXO II - ARTIGOS CIENTÍFICOS E TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO .....</b>	<b>170</b>

## DIAGRAMA CONCEITUAL DA TESE

Figura 1- Diagrama conceitual da tese.

### IMOBILIZAÇÃO E COIMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

#### Por quê?

- Importância do uso de enzimas como biocatalisadores industriais;
- Necessidade de desenvolver uma metodologia viável e eficiente para a coimobilização de enzimas em um mesmo suporte;
- Investigar o uso de nanopartículas magnéticas como suporte para a imobilização e coimobilização de enzimas.

#### Quem já fez?

- Enzimas coimobilizadas ainda não são aplicadas industrialmente em larga escala.

#### Hipótese?

- É possível utilizar nanopartículas de magnetita como suporte para a imobilização de duas enzimas de natureza distinta?
- Os derivados obtidos a partir da coimobilização apresentam uma boa estabilidade para o uso em reações de interesse industrial?

#### Como fazer?

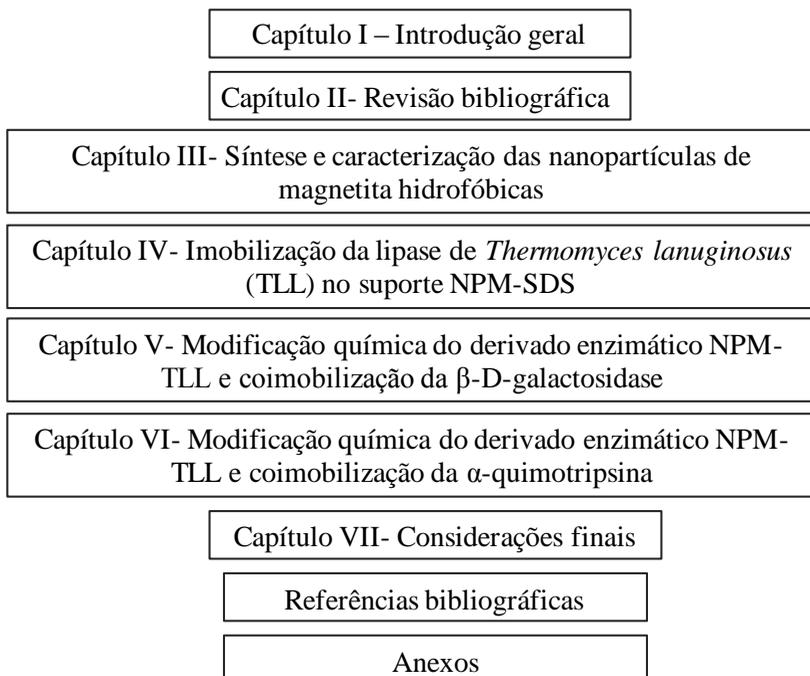
- Estudar o processo de interação entre a nanopartícula magnética e a enzima;
- Modificar o derivado enzimático quimicamente e aplicá-lo para a coimobilização de outra enzima distinta;
- Avaliar o efeito de modificações através de entrecruzamento na estabilização dos derivados enzimáticos;
- Avaliar a estabilidade dos derivados enzimáticos frente a diferentes parâmetros como temperatura e pH.



## ORGANOGRAMA DO DOCUMENTO DE TESE

O presente documento foi organizado conforme disposto na Figura 2. No Capítulo I foi apresentada uma introdução geral ao tema da tese, seguido de uma revisão bibliográfica mais detalhada no Capítulo II. Em função dos diferentes caminhos traçados no decorrer da pesquisa, os resultados foram divididos entre os Capítulos III, IV, V e IV; cada um com objetivos específicos abordando as etapas de síntese do suporte magnético, a imobilização de lipases e a modificação química de derivados enzimáticos para a coimobilização da  $\beta$ -D-galactosidase e  $\alpha$ -quimotripsina. Nos Capítulos VII foram apresentadas as considerações finais, finalizando com o Capítulo VIII com sugestões para trabalhos futuros. Por fim, foram inseridas as referências bibliográficas e anexos.

Figura 2- Organograma do documento de tese.





## 1. INTRODUÇÃO GERAL

A utilização de enzimas como catalisadores em processos biotecnológicos há muitos anos vem sendo aplicada nos mais diversos setores industriais, visando, por exemplo, a obtenção de novos produtos alimentícios, fármacos, têxteis, química fina, bioenergia, entre outros. Esta crescente aplicação deve-se a um conjunto de vantagens apresentadas pelas enzimas frente aos catalisadores químicos convencionais, que geralmente necessitam de altas temperaturas para a reação, pHs extremos, além de serem pouco versáteis (AHMAD; SARDAR, 2015; CAO et al., 2012; MENDES, 2009). Devido a este grande interesse industrial muitos avanços foram atingidos nas áreas de microbiologia, química e engenharia de proteínas, tanto com o objetivo de viabilizar o uso destes biocatalisadores em reatores industriais, quanto para obter novos produtos modificados a fim de atender às novas necessidades de mercado (BALCÃO; VILA, 2015; BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

No entanto, o principal problema do processo catalisado por enzimas é o alto custo do biocatalisador, além da sua baixa estabilidade frente a condições reacionais extremas e da possível inativação por determinados agentes químicos ou físicos (temperatura, pH, solventes orgânicos, sais, entre outros) (VILLENEUVE *et al.*, 2000). Neste contexto, as técnicas de imobilização de enzimas têm se mostrado uma poderosa e eficiente ferramenta para a otimização de praticamente todas as propriedades específicas das enzimas, como a atividade, estabilidade, especificidade, seletividade e diminuição de efeitos de inibição; além de facilitar a recuperação e reutilização do biocatalisador (BOLIVAR et al., 2009; FERNANDEZ-LORENTE et al., 2007; MATEO et al., 2007).

Tendo em vista não somente os benefícios já citados, as técnicas de imobilização de enzimas também viabilizam o desenvolvimento de biocatalisadores multifuncionais mediante a coimobilização de diferentes tipos de enzimas concomitantemente em um mesmo suporte. O biocatalisador coimobilizado pode atuar de diversas formas: melhorando a estabilidade de uma enzima através da geração *in-situ* do seu substrato; facilitando reações que ocorrem em múltiplas etapas através da eliminação de uma delas; ou auxiliando na eliminação de subprodutos indesejáveis (BETANCOR; LUCKARIFT, 2010). Os biocatalisadores multifuncionais também possuem uma larga aplicabilidade em sistemas reacionais conhecidos como “reações em cascata” ou “reações dominó”, que são reações complexas onde o

produto ou subprodutos da primeira reação atua como substrato em uma segunda reação, e assim o processo continua sucessivamente (PEIRCE *et al.*, 2016).

A coimobilização de enzimas em um mesmo suporte é um processo que ainda enfrenta uma série de limitações, uma vez que a estabilidade geral do biocatalisador fica condicionada à da enzima menos estável. Caso uma das enzimas seja inativada todo o biocatalisador acaba sendo descartado. Outro fator diz respeito ao protocolo de imobilização adotado, que necessita ser adequado a todas as enzimas utilizadas, o que nem sempre é possível (PEIRCE *et al.*, 2016). Dado a dificuldade de encontrar metodologias versáteis, o número de trabalhos relacionados à coimobilização ainda é restrito quando comparado aos processos envolvendo uma só enzima.

Associada às recentes tecnologias desenvolvidas no campo de imobilização de enzimas, a nanotecnologia é uma das áreas que vem ganhando grande destaque. O uso de materiais nanoparticulados oferece uma série de vantagens devido ao seu tamanho e propriedades físicas bastante específicas. Dentro deste grande grupo de materiais, as nanopartículas magnéticas (NPM) vêm sendo bastante exploradas, dadas suas aplicações em áreas como biotecnologia, biomedicina, engenharias, ciência de materiais e meio-ambiente (CHALKIAS, 2007; CIPOLATTI *et al.*, 2014; ELNASHAR, 2011; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

As NPM obtidas a partir de óxidos metálicos, como a magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e a maguemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_4$ ), são alguns dos materiais mais explorados para aplicações na área de biotecnologia (MAURICIO *et al.*, 2013), devido suas propriedades multifuncionais como biocompatibilidade, superparamagnetismo, baixa toxicidade e o pequeno tamanho das partículas (REN *et al.*, 2011). Estas características as tornam atrativas no campo da tecnologia enzimática como suporte para imobilização de biocatalisadores. Porém, o processo de imobilização de enzimas em NPM envolve uma série de passos relacionados à preparação das partículas, à ativação do suporte e à inserção da enzima no suporte ou matriz polimérica (CAO *et al.*, 2012), etapa que ainda apresenta algumas dificuldades e possibilidades de exploração de novas técnicas.

Assim sendo, tendo como motivação solucionar algumas destas limitações em relação ao processo de coimobilização de enzimas, aliado às vantagens relacionadas ao uso de nanomateriais magnéticos como suporte enzimático, o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar diferentes protocolos para a imobilização de lipases e a coimobilização destas com outros grupos de enzimas como as  $\beta$ -D-galactosidas e

quimotripsinas. A escolha das enzimas estudadas foi determinada em função da possibilidade de modificação superficial da lipase, e da escolha de proteínas com tamanhos moleculares distintos. Adicionalmente, a combinação destas enzimas em um único derivado pode, por exemplo, atuar em conjunto na em processos que da indústria de alimentos envolvendo a transformação de óleos e gorduras e hidrólise da lactose ou hidrólise de proteína de soja.



## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo serão abordados os principais tópicos relacionados à síntese de nanopartículas magnéticas (NPM), explorando os principais métodos de síntese e funcionalização das mesmas. Será discutido, também, o uso destes materiais relacionado às técnicas de imobilização e coimobilização de enzimas, com especial atenção aos trabalhos envolvendo lipases, lactases e proteases, que foram os grupos de enzimas selecionados neste estudo.

### 2.1 APLICAÇÃO DE ENZIMAS COMO BIOCATALISADORES

As enzimas são catalisadores de origem biológica que possuem propriedades particulares que as tornam atrativas como catalisadores em processos de biotransformação. Dentre estas propriedades, pode-se destacar a elevada velocidade de reação em comparação com os catalisadores químicos; a utilização em condições reacionais brandas (temperaturas próximas da ambiente, pH fisiológico e pressão atmosférica), a biocompatibilidade e sua origem renováveis. Apresentam, ainda, uma alta especificidade em relação ao substrato, regio e enantiosseletividade (MATEO *et al.*, 2007). Além disso, o uso de enzimas geralmente evita a necessidade de grupos funcionais de proteção e/ou ativação, proporcionando rotas de síntese com menos etapas do que as rotas químicas, gerando menos resíduos e aumentando a sustentabilidade (SHELDON, 2007).

Graças aos avanços da biotecnologia e engenharia de proteínas, atualmente é possível produzir praticamente todas as enzimas comercialmente a preços aceitáveis, manipulando-as de forma que exibam propriedades particulares, aliando especificidade, atividade, seletividade, estabilidade e pH ótimo (SHELDON; VAN PELT, 2013). Na indústria, reações catalisadas por enzimas possuem uma grande aplicabilidade em praticamente todos os setores: na indústria de alimentos, em processos de panificação, fabricação de produtos lácteos, conversão do amido, processamento de bebidas (sucos de fruta e vegetais, cerveja e vinho); na indústria têxtil, especialmente na etapa de acabamento dos produtos; nas indústrias farmacêuticas e de produtos de química fina, papel e celulose, detergentes e, na área ambiental, no tratamento de resíduos e efluentes (ANSARI; HUSAIN, 2012; DICOSIMO *et al.*, 2013; LIESE; HILTERHAUS, 2013). As enzimas também têm ganhado uma participação especial nos últimos anos na

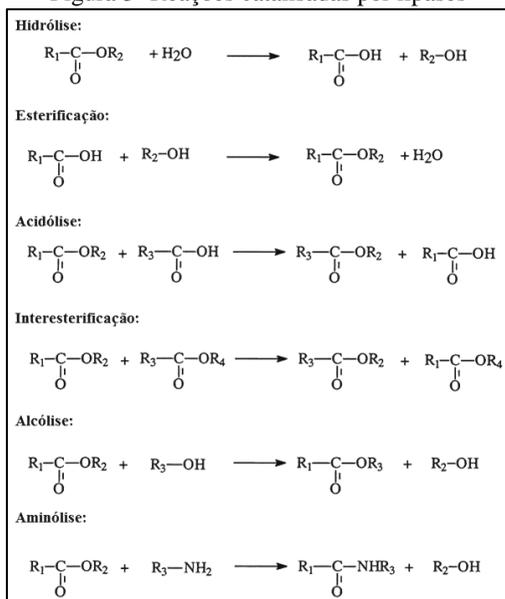
produção de biocombustíveis, como o biodiesel, bioetanol, biogás, biohidrogênio e conversão de biomassa (AHMAD; SARDAR, 2015; PAULY; KEEGSTRA, 2008; PURI; BARROW; VERMA, 2013).

A seguir serão tratadas mais detalhadamente as enzimas e os processos envolvendo as três enzimas estudadas neste trabalho: lipases,  $\beta$ -D-galactosidas e  $\alpha$ -quimotripsinas.

### 2.1.1 Lipases

As lipases (triacilglicerol acilhidrolases E.C. 3.1.1.3) são enzimas hidrolíticas que atuam nas ligações ésteres presentes em triacilgliceróis e seus derivados, catalisando reações de hidrólise, esterificação, transesterificação (acidólise, interesterificação, alcólise) e aminólise (Figura 3).

Figura 3- Reações catalisadas por lipases



Fonte: VILLENEUVE *et al.* (2000).

Estas enzimas ocorrem de forma generalizada na natureza estando presentes em diversos organismos, podendo ser produzidas por cultivo de células usando várias espécies de micro-organismos, incluindo animais, plantas, fungos e bactérias. No entanto, as lipases

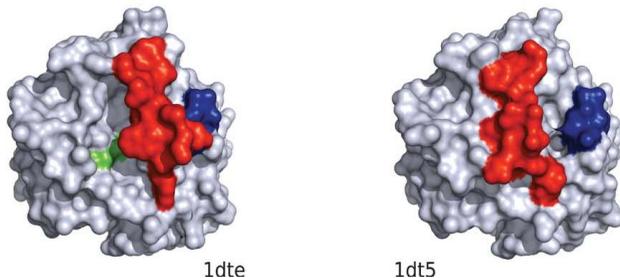
produzidas de fonte microbiana são as que possuem maior interesse comercial, devido à facilidade de produção em larga escala. A utilização de lipases em reações de síntese orgânica apresenta inúmeras vantagens, pois não necessitam de cofatores, atuam em uma faixa de pH relativamente grande, são muito estáveis neste meio e apresentam especificidade, regioseletividade, quimiosseletividade e enantioseletividade (TORRES *et al.*, 2006).

As lipases possuem um mecanismo próprio bastante peculiar e que ainda não é compreendido em sua totalidade (BRZOZOWSKI *et al.*, 2000). Devido a essas características próprias e diferenciadas, despertam muito interesse da comunidade científica, sendo alvo de inúmeras pesquisas relativas à sua estrutura e forma de atuação. O sítio ativo dessas enzimas é formado por uma tríade catalítica composta por resíduos de serina, histidina, ácido aspártico ou ácido glutâmico. Esta tríade catalítica, localizada no interior de uma cavidade hidrofóbica, é protegida por uma estrutura polipeptídica helicoidal que atua como uma espécie de tampa (ou *lid*). Em algumas lipases, como a lipase B de *Candida antartica* a tampa é praticamente inexistente. Em outras, são bastante volumosas ou ainda, como no caso da lipase de *Bacillus thermocatenuatus*, podem apresentar uma dupla tampa (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010).

A tampa tem como função isolar a cavidade hidrofóbica do ambiente hidrofílico, protegendo o sítio ativo. Na presença de um sistema homogêneo, a lipase encontra-se em um estado de equilíbrio entre duas conformações: uma com a tampa fechada, onde o sítio ativo fica isolado do meio externo em um estado inativo; outra com a tampa aberta, onde o sítio ativo fica exposto ao meio reacional. Quando em um ambiente hidrofóbico, como por exemplo, uma gota de óleo, um suporte ou mesmo outra molécula de lipase em sua forma aberta, a tampa se move permitindo o contato entre este ambiente e os resíduos hidrofóbicos presentes na vizinhança do sítio ativo. Desta forma, a lipase é adsorvida através das zonas hidrofóbicas e o sítio ativo exposto ao meio reacional. Este mecanismo é chamado de ativação interfacial (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010; FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2006).

A Figura 4 mostra a representação tridimensional da estrutura cristalina da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (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 formada por aminoácidos (REHM; TRODLER; PLEISS, 2010).

Figura 4- Representação tridimensional da estrutura cristalina da lipase de *Thermomyces lanuginosus* com a tampa (vermelho) na forma aberta (à esquerda) e fechada (à direita), o sítio ativo (verde) e uma região flexível composta por aminoácidos (azul).

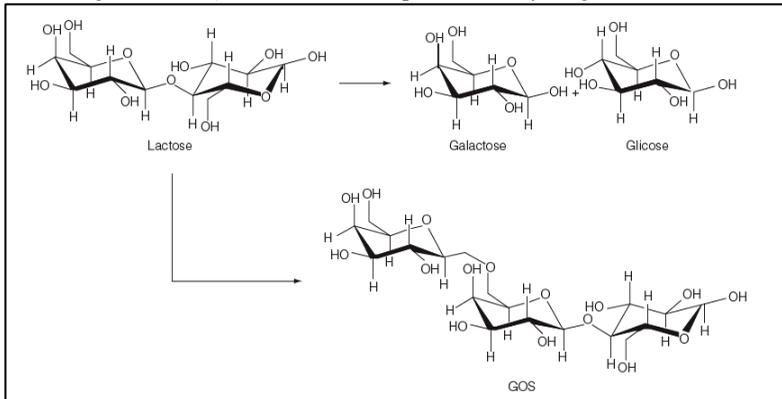


Fonte: REHM, TRODLER e PLEISS (2010).

### 2.1.2 $\beta$ -D-galactosidases

As  $\beta$ -D-galactosidases (EC 3.2.1.23), também conhecidas como lactases, são enzimas da classe das hidrolases, que atuam na catálise resíduo terminal  $\beta$ -galactopiranosil da lactose (Gal $\beta$ 1-4Glc), formando glucose e galactose (SANTIAGO *et al.*, 2004). Estas enzimas possuem duas aplicações principais: a remoção de lactose de produtos lácteos a partir de reações de hidrólise da lactose; e a síntese de galacto-oligosacarídeos (GOS) que podem ser aplicados como prébióticos (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). A Figura 5 mostra a representação das reações de conversão da lactose pela enzima  $\beta$ -D-galactosidase (MARTINS; BURKERT, 2009).

As  $\beta$ -D-galactosidases são encontradas na natureza a partir de diferentes fontes, como vegetais, órgãos de animais e micro-organismos. As enzimas produzidas a partir de micro-organismos como fungos filamentosos, bactérias e leveduras apresentam a vantagem da produção em larga escala (SANTIAGO *et al.*, 2004). Diferentes tipos de  $\beta$ -D-galactosidases a partir de micro-organismos vêm sendo estudadas e purificadas, porém, para a produção em escala comercial são selecionados micro-organismos consideráveis seguros como as leveduras de *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Candida pseudotropicalis*; os fungos de *Aspergillus niger* e *Aspergillus oryzae* e espécies de *Bacillus* como *Bacillus stearothermophilus* (PANESAR *et al.*, 2006).

Figura 5- Reações de conversão pela enzima  $\beta$ -D-galactosidase.

Fonte: MARTINS e BURKERT (2009).

A temperatura ótima e pH de atuação destas enzimas diferem conforme sua origem. As  $\beta$ -galactosidases obtidas a partir de fungos possuem um pH ótimo entre 3,5 a 4,5, enquanto as  $\beta$ -galactosidases de leveduras têm o seu pH ótimo entre 6,5 e 7,0 (PANESAR *et al.*, 2006). Devido a boa aplicabilidade em pH próximos ao neutro, as enzimas obtidas a partir de leveduras são preferidas para a aplicação na indústria de alimentos, pois demonstram um bom desempenho para reações de hidrólise da lactose (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). Como exemplo, pode-se destacar a  $\beta$ -galactosidase produzida pela levedura *Kluyveromyces lactis*, que possui peso molecular em torno de 228 kDa e é uma das enzimas mais empregadas industrialmente. Suas condições ótimas de atividade hidrolítica ocorrem em pH 7,0 e temperaturas de 37°, condições que são bastante interessantes no contexto de processos industriais (HARJU; KALLIOINEN; TOSSAVAINEN, 2012; HUSAIN *et al.*, 2011).

Industrialmente, a  $\beta$ -galactosidase apresenta um papel importante na indústria de laticínios. A lactose, principal carboidrato presente no leite e seus derivados, é um dissacarídeo composto por glicose e galactose unidos por uma ligação glicosídica  $\beta$ 1 $\rightarrow$ 4 (WILT *et al.*, 2010). Possui uma baixa doçura e solubilidade, não sendo facilmente digerida por uma significativa parcela da população global. Estas pessoas não só sofrem com problemas de má absorção, mas também com insuficiência geral dos processos digestivos normais (PANESAR *et al.*, 2006).

A lactose é solúvel em água, estando assim associada à parcela do soro do leite de alimentos lácteos. Desta forma, alimentos lácteos mais densos apresentam uma menor quantidade de lactase (HERTZLER *et*

*al.*, 2013). Além do mais, a lactose é um açúcar higroscópico e possui uma forte tendência a absorver sabores e odores, causando problemas como cristalização e formação de grânulos em alimentos refrigerados (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). A aplicação destas enzimas nos processos de hidrólise da lactose auxilia na obtenção de produtos com uma qualidade superior, evitando a cristalização em produtos lácteos como doce de leite, leite condensado, leite concentrado congelado, misturas para sorvetes e iogurtes, melhorando as características organolépticas destes alimentos como cor e sabor (SANTIAGO *et al.*, 2004).

O intestino delgado é normalmente impermeável à lactose. Esta, por sua vez, é hidrolisada pela enzima  $\beta$ -D-galactosidase gerando os monossacarídeos glucose e galactose, que são rapidamente transportados e absorvidos pelo intestino delgado (HERTZLER *et al.*, 2013; WILT *et al.*, 2010). Os indivíduos intolerantes à lactose possuem um baixo nível desta enzima no intestino, o que leva a uma dificuldade em consumir leite e derivados lácteos (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010). O excesso da lactose no intestino grosso pode levar a uma desidratação do tecido devido a efeitos osmóticos, a uma baixa absorção de cálcio devido sua baixa acidez e à fermentação da lactose pela microflora intestinal, provocando diarreia, distensão abdominal, flatulência, inchaço e cólicas (PANESAR; KUMARI; PANESAR, 2010).

As síndromes relacionadas à má absorção da lactose pelo intestino podem ser classificadas de três formas distintas: 1) deficiência de lactase, relacionada a baixas concentrações de  $\beta$ -D-galactosidase no intestino delgado em relação às concentrações observadas em lactentes; 2) má absorção de lactose, relacionada a uma falha do intestino delgado que o impede de absorver a maior parte da lactose ingerida; e 3) intolerância à lactose, que é uma resposta sintomática à má absorção de lactose (WILT *et al.*, 2010).

Como problema recorrente, uma vez que a intolerância a lactose leva a um menor consumo de leite e produtos derivados por parte destes indivíduos, estes podem vir a sofrer com problemas como osteoporose e fraturas ao longo da vida, devido à deficiência causada pela carência de cálcio. Embora existam muitos alimentos não lácteos ricos em cálcio, a falta de uma dieta balanceada pode levar ao consumo ineficiente deste mineral (WILT *et al.*, 2010).

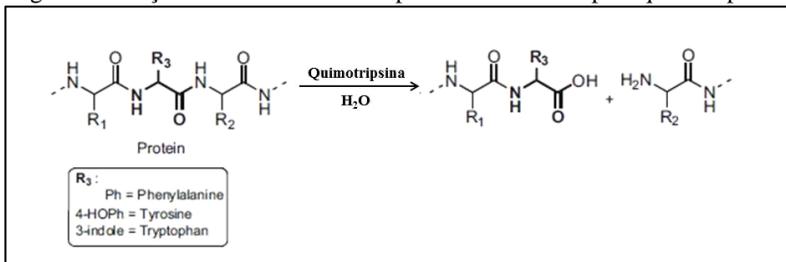
Pensando no crescente número de pessoas que possuem intolerância à lactose, a indústria de laticínios vem investindo em tecnologias para o desenvolvimento de produtos sem lactose. Embora a utilização de  $\beta$ -D-galactosidase na indústria de alimentos venha

ganhando forças, ainda existem limitações nos processos industriais que utilizam estes biocatalisadores, como a baixa estabilidade operacional e a dificuldade em reutilizar as enzimas. Assim, os métodos de imobilização de enzimas surgem como uma alternativa eficiente para solucionar estes problemas.

### 2.1.3 $\alpha$ - Quimotripsina

A  $\alpha$ -quimotripsina (QM) (EC 3.4.21.1) é uma enzima digestiva pertencente à classe das serinas proteases, que atua nas reações de hidrólise de ligações peptídicas. Elas agem preferencialmente nas ligações polipeptídicas vizinhas a carboxila de aminoácidos aromáticos, como tirosina, fenilalanina e triptofano (CZAPINSKA; OTLEWSKI, 1999; KUMARI et al., 2016). A Figura 6 descreve uma reação de hidrólise de uma proteína catalisada pela quimotripsinas.

Figura 6- Reação de hidrólise de uma proteína catalisada pela quimotripsina.



**Fonte:** NETTO; TOMA; ANDRADE (2013).

As QM são enzimas de baixo peso molecular, em torno de 20- 25 kDa, que possuem uma estrutura formada por dois domínios perpendiculares do tipo barril  $\beta$ , cada um composto por seis estruturas  $\beta$  antiparalelas e uma  $\alpha$ -hélice terminal. O sítio catalítico composto por resíduos de serina, ácido aspártico e histidina (Ser195, Asp102 e His57) está localizado em uma espécie de “bolsa” situada entre os dois domínios onde as interações entre a enzima e o substrato atuam como conectores entre as duas partes (CZAPINSKA; OTLEWSKI, 1999).

A QM é muito utilizada nas indústrias farmacêutica, em curtumes e, principalmente, alimentícia (DISHLYUK; NOVOSELOVA; ROZALYONOK, 2013). Na indústria alimentícia, as QM participam de processos que envolvem a melhora de qualidade de produtos ricos em proteína, na diminuição de turbidez resultante das proteínas em sucos de frutas e licores alcoólicos, e, ainda, na hidrólise da proteína de soja

(YADAV; PATEL; JAGANNADHAM, 2011). Já suas aplicações na indústria farmacêutica incluem a síntese de fármacos com ação anti-inflamatória e em medicamentos próprios para problemas relacionados à má-digestão (KUMARI *et al.*, 2016). Estas enzimas também vêm sendo muito aplicada como um modelo de estudo para a compreensão de relações entre estrutura-função, vias de enovelamento de proteínas e síntese de novos peptídeos (FAGUNDES, 2011; YADAV; PATEL; JAGANNADHAM, 2011).

Uma das maiores limitações ao uso de proteases como a QM em processos industriais refere-se à sua estabilidade. A maioria das enzimas pertencentes a esta classe sofrem autólise (ou autodegradação), que é um mecanismo regulador que controla a atividade principalmente de serino-proteases, podendo levar a inativação de seu sítio ativo por autoclivagem (FAGUNDES, 2011). Para contornar esta limitação, a inativação destas enzimas pode ser contornada por métodos de imobilização.

### 2.2 IMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Conforme visto anteriormente, as enzimas apresentam uma gama de vantagens. Adicionalmente, os produtos obtidos através de reações enzimáticas apresentam um alto grau de pureza, o que diminui os custos de produção associados às etapas de separação, purificação e tratamento de resíduos (CAMINO FELTES *et al.*, 2011; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

No entanto, sua aplicação industrial é dificultada pela falta de estabilidade operacional em longo prazo e a dificuldade de recuperação e reutilização das mesmas. Essas desvantagens podem ser contornadas recorrendo-se a métodos de imobilização (AHMAD; SARDAR, 2015). O principal objetivo da imobilização de uma enzima é obter um biocatalisador que, em comparação com a sua forma livre, mantenha sua atividade e estabilidade durante o processo em que está atuando (NASCIMENTO *et al.*, 2012). Por meio da imobilização em suportes sólidos pode ocorrer um aumento na estabilidade do catalisador, prolongando sua vida útil, facilitando o manuseio, a recuperação e a reutilização. A reutilização é um fator importante para a avaliação do custo de um processo catalisado por enzimas, pois reflete na alta produtividade catalítica (kg de produto/ kg de enzima) que, por sua vez, determina o custo da enzima por kg de produto (SHELDON; VAN PELT, 2013). Na literatura é possível encontrar inúmeros métodos de imobilização, seja por adsorção simples ou por complexos sistemas de

imobilização. Os tópicos a seguir apresentam de forma sucinta as diferentes formas de ligação da enzima ao suporte.

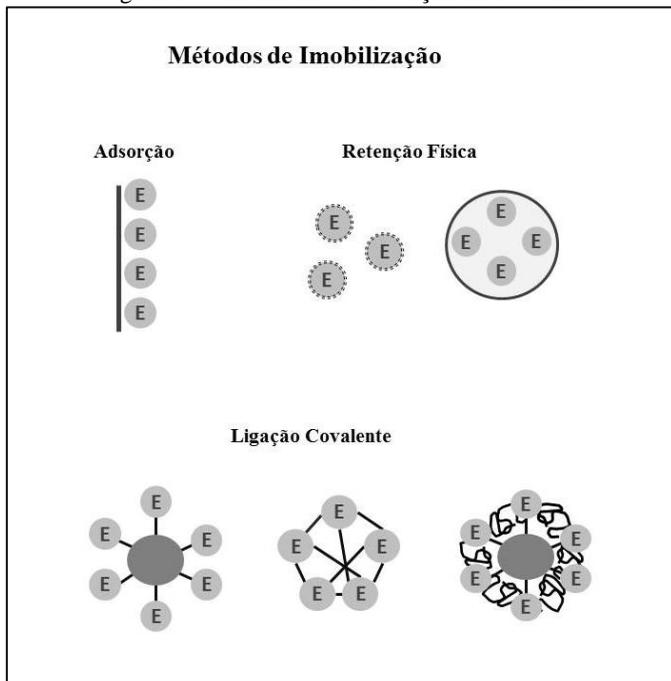
### 2.2.1 Métodos de Imobilização de Enzimas

O processo de imobilização de enzimas consiste, em termos gerais, no confinamento ou localização da mesma em um suporte sólido ou em matriz de confinamento, podendo ocorrer por diferentes maneiras, dependendo do tipo de material utilizado como suporte, da metodologia aplicada e do objetivo desejado (LUKOVI; KNEŽEVI; BEZBRADICA, 2011; MATEO *et al.*, 2007). Tradicionalmente, os métodos de imobilização de enzimas são classificados em quatro categorias: 1) adsorção 2) retenção física (conhecido como encapsulamento ou aprisionamento) 3) ligação covalente, e 4) entrecruzamento de ligações (ou *cross-linking*). O tipo de interação entre a enzima e o material do suporte pode ser física (Van der Waals, ligações de hidrogênio, interações hidrofóbicas ou ligações iônicas) ou química (ligações covalentes) (HOMAEI *et al.*, 2013) (Figura 7). As propriedades finais do derivado enzimático obtido serão controladas pelo tipo de interação entre a enzima e o suporte (SHELDON, 2007).

A imobilização através de adsorção física ocorre através de interações fracas envolvendo ligações de hidrogênio, van der Waals, ligações iônicas ou interações hidrofóbicas entre a enzima e o suporte, sem que haja a necessidade de modificação (ou funcionalização) do suporte. Este tipo de imobilização é o mais benéfico para a enzima em relação à preservação do sítio ativo, causando pouca ou nenhuma alteração na estrutura e mantendo a atividade catalítica. Além do mais, caso a enzima seja irreversivelmente desativada, é possível recuperar o suporte para uma posterior reutilização a partir da dessorção da enzima inativa (JESIONOWSKI; ZDARTA; KRAJEWSKA, 2014).

O sucesso e a eficiência da adsorção física de enzimas em um suporte sólido dependem de uma série de parâmetros, como o tamanho da proteína adsorvida e a características físicas do suporte (porosidade, área superficial e volume dos poros). A concentração máxima de proteínas adsorvida por quantidade de suporte cresce até atingir um ponto de saturação do suporte, variando de acordo com as características tanto do suporte, quanto da proteína. Geralmente a maior eficiência de imobilização ocorre quando o pH é próximo ao ponto isoelétrico da enzima durante a imobilização (VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Figura 7- Métodos de imobilização de enzimas.



**Fonte:** desenvolvido pela autora.

Embora seja um protocolo simples e economicamente atraente, a imobilização por adsorção é, em geral, mais fraca do que a obtida através de métodos como encapsulamento ou ligações covalentes, sendo que a enzima dificilmente consegue permanecer fixada ao suporte mediante condições industriais intensas (forte agitação, alta concentração de substrato e produto, alta força iônica) (BRENA; GONZÁLEZ-POMBO; BATISTA-VIERA, 2013).

A imobilização através de ligação covalente ocorre através de grupos ativos do suporte e nucleófilos provenientes da enzima, como resíduos de aminoácidos de lisina ou arginina, grupos carboxílicos do ácido aspártico ou ácido glutâmico, hidroxilas da serina e treonina, ou grupos sulfidrilas da cistina. No entanto, a ligação através dos grupos amino das proteínas são os mais comuns, pois estão presentes na maioria das proteínas, sendo muito reativos mesmo sem uma ativação prévia (BUKHARI *et al.*, 2014). Este tipo de ligação gera um derivado enzimático mais estável frente às condições reacionais (temperatura, pH, uso de solventes, presença de inibidores), além de prevenir a dessorção

da enzima. Entretanto, devido à alta força da ligação envolvida, este método pode causar alterações no sítio ativo da enzima, causando uma diminuição da atividade catalítica (MENDES; OLIVEIRA, 2011).

Outra metodologia envolve a formação de ligações covalentes utilizando agentes bifuncionais como o glutaraldeído e 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (XU *et al.*, 2014) a partir da reação dos grupos amino presentes na enzima. Este método pode ser aplicado, também, na ausência de suportes a partir do entrecruzamento de ligações entre as enzimas formando agregados enzimáticos insolúveis (SHELDON, 2007).

A retenção física, também conhecida como confinamento ou encapsulamento, é um método físico de imobilização. Neste caso, a enzima fica retida no interior de um suporte formado por uma membrana semipermeável ou em uma matriz polimérica. Este procedimento evita qualquer modificação negativa no sítio ativo da enzima, pois a enzima não interage diretamente com o suporte através de qualquer tipo de ligação. Por outro lado, problemas difusionais entre o substrato e o produto pode ser um fator limitador, sendo necessária uma alta concentração de substrato. Assim sendo, este tipo de derivado enzimático possui um melhor desempenho com substratos com moléculas pequenas (HOMAEI *et al.*, 2013; VILLENEUVE *et al.*, 2000).

Outros métodos que incluem combinações dos métodos originais ou aplicações para um tipo de enzima ou suporte em particular são descritos com frequência. No entanto, nenhum método ou suporte pode ser considerado ideal para todos os tipos de enzimas e suas aplicações, dado as diversas características químicas das enzimas, composição dos suportes e substratos, design dos reatores utilizados e produto final desejado. Cada método descrito apresenta suas vantagens e desvantagens, sendo necessário avaliar especificamente cada caso. A adsorção é simples, econômica e eficaz, mas apresenta uma fraca fixação da enzima, é interessante, por exemplo, se o custo do suporte for elevado, uma vez que este poderá ser facilmente reaproveitado com a dessorção do catalisador; ligação covalente e entrecruzamento são eficazes e duráveis, mas além de caros podem diminuir o desempenho da enzima diante de possíveis modificações estruturais; por fim, os métodos de retenção física ao mesmo tempo que preservam a estrutura nativa da enzima, por outro podem acarretar problemas de desempenho e difusionais causados pela membrana ou matriz escolhida (HOMAEI *et al.*, 2013).

### 2.2.2 Nanopartículas Magnéticas Aplicadas como Suporte para a Imobilização Enzimática

O tipo de suporte utilizado na imobilização de enzimas vai depender das características que desejamos obter no derivado enzimático. Em termos gerais, um bom suporte necessita ter algumas características básicas, como por exemplo, ser biocompatível, inerte, apresentar uma boa resistência física e um baixo custo. (MATEO *et al.*, 2007).

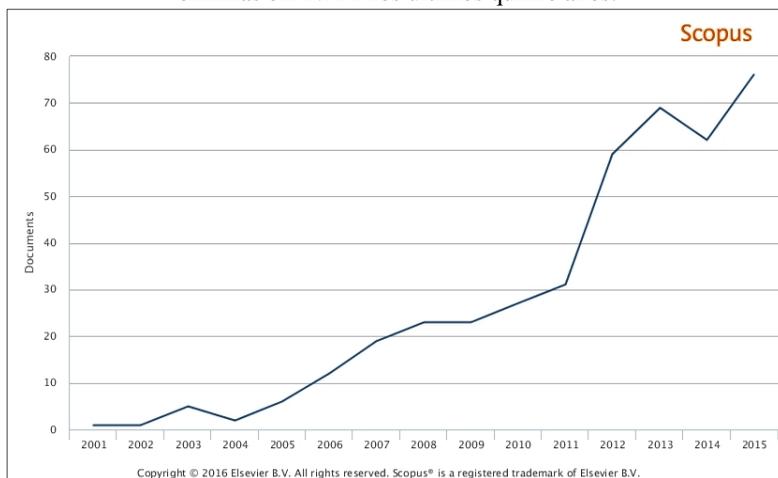
Uma série de novas metodologias e suportes para imobilização de diferentes tipos de enzimas vem sendo estudados constantemente. Nos últimos anos, as nanopartículas baseadas em diferentes materiais, como óxidos metálicos, partículas magnéticas e polímeros têm despertado crescente interesse da comunidade científica, surgindo como uma tendência na área de tecnologia enzimática (CHALKIAS, 2007; CIPOLATTI *et al.*, 2014; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; PURI; BARROW; VERMA, 2013).

Os nanomateriais apresentam uma série de vantagens, como por exemplo, a elevada área superficial em relação ao seu volume, o aumento da mobilidade das partículas, fatores estes que podem melhorar consideravelmente a eficiência catalítica da enzima imobilizada (ANSARI; HUSAIN, 2012; SUI *et al.*, 2012). Adicionalmente, problemas difusionais costumam ser mais pronunciados com substratos macromoleculares, tornando este tipo de material uma escolha assertiva como suporte (AHMAD; SARDAR, 2015).

Dentro deste grupo de nanomateriais, as nanopartículas magnéticas (NPM) destacam-se por acrescentar a facilidade extra de recuperação do meio reacional através da simples aplicação de um campo magnético, o que pode minimizar o custo operacional do processo e também aumentar a pureza do produto (JIANG *et al.*, 2009; REN *et al.*, 2011; SUI *et al.*, 2012). Esta vantagem se torna ainda mais interessante quando o meio reacional é composto por substratos viscosos como óleos e gorduras, por exemplo, que dificultam a separação do biocatalisador através de métodos convencionais.

Assim, o uso destas nanopartículas é cada vez mais estudado, visando aperfeiçoar e adaptar estes suportes para a aplicação industrial. A Figura 8 apresenta um gráfico onde é possível visualizar a evolução no número de publicações relacionadas ao tema nos últimos quinze anos, obtidos na base de dados bibliográficos Scopus®.

Figura 8- Evolução do número de publicações relacionadas à imobilização de enzimas em NPM nos últimos quinze anos.



Fonte: Scopus®.

### 2.2.2.1 Nanopartículas Magnéticas

As nanopartículas (NPs) podem ser definidas, de uma forma geral, como partículas ultrafinas com tamanho reduzido. Para alguns autores, esta definição engloba partículas com tamanhos compreendidos entre 1 e 100 nm. Por outro lado, entende-se que partículas com tamanhos compreendidos entre 1 e 1000 nm devem ser tratadas diferentemente das partículas submicrométricas (tamanhos maiores que 1000 nm ou 1  $\mu\text{m}$ ) (YOKOYAMA et al., 2008). Nestas dimensões, as propriedades físicas, químicas e biológicas das NPs sofrem alterações em relação à mesma substância na forma molecular ou *bulk* (fração molecular) (CAMPONESCHI et al., 2008; NAGARAJAN, 2008). Porém, quando as partículas são maiores que 100 nm, elas podem não apresentar, necessariamente, características ou aplicações diferenciadas em relação à substância *bulk* (POHLMAN; GUTERRES, 2010).

Como consequência deste tamanho reduzido, as NPs apresentam boa parte dos átomos e moléculas localizados na sua superfície e uma elevada área superficial por volume. As NPs podem ser obtidas a partir de materiais com diferentes naturezas químicas, como metais, óxidos metálicos, silicatos, cerâmicas, polímeros e biomoléculas, além de apresentarem diferentes morfologias. Geralmente, estas partículas são preparadas com modificações superficiais de forma a atenderem o

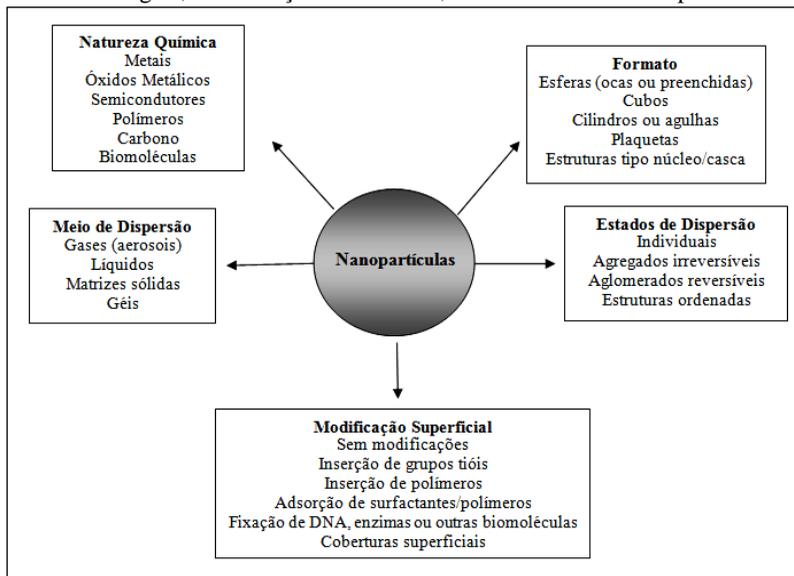
objetivo a que se destinam, como por exemplo, interação com enzimas e consequente imobilização desta (CAMPONESCHI et al., 2008; LAURENT et al., 2008; NAGARAJAN, 2008).

Conforme o tipo de material, esta diminuição de tamanho implica no surgimento de outras características particulares. Nos óxidos metálicos, por exemplo, ocorre um aumento do comportamento magnético, enquanto partículas metálicas individuais exibem um comportamento superparamagnético (NAGARAJAN, 2008).

Existe uma grande variedade de rotas de síntese, métodos de estabilização, modificação superficial e materiais para a cobertura das nanopartículas. A

Figura 9 mostra um resumo dos diversos materiais utilizados na obtenção de NPs, as diferentes morfologias, as possíveis modificações estruturais, meios e estados de dispersão.

Figura 9- Resumo dos diferentes materiais utilizados na obtenção de NPs, morfologias, modificações estruturais, meios e estados de dispersão.



Fonte: Adaptado de NAGARAJAN (2008).

#### 2.2.2.2 Propriedades Magnéticas

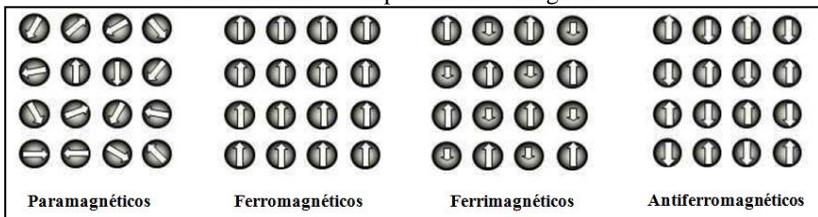
A propriedade magnética pode ser considerada uma propriedade básica das substâncias, pois todas elas a possuem com alguma

intensidade, sejam elas substâncias líquidas, sólidas ou gasosas (SINNECKER, 2000). Porém, podem ser considerados materiais magnéticos aqueles que, ao serem submetidos a um campo magnético externo, geram uma resposta a este estímulo (MASUDA et al., 2008).

O comportamento magnético dos materiais frente a um campo magnético externo é determinado pela origem de seus dipolos magnéticos e pela natureza da interação entre eles. Os dipolos magnéticos tem origem no momento angular orbital e no *spin* dos elétrons dos íons ou átomos que formam a matéria, dependendo então da distribuição eletrônica de cada átomo ou molécula. A grandeza magnética é representada pelo vetor de magnetização  $\vec{M}$  (AUGUSTUS; RIBEIRO, 2000).

Os materiais magnéticos dividem-se basicamente em quatro categorias: paramagnéticos, ferromagnéticos, antiferromagnéticos e ferrimagnéticos. A Figura 10 representa a orientação do campo magnético em cada uma dessas categorias.

Figura 10- Representação da orientação dos momentos magnéticos em materiais com diferentes comportamentos magnéticos.



Fonte: SCHETTINO JR (2009).

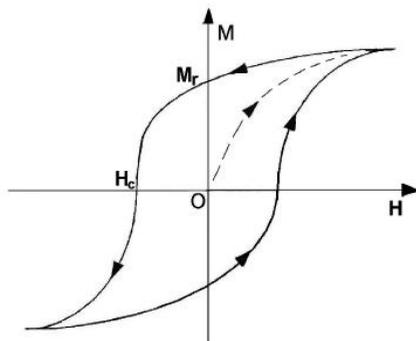
Os materiais paramagnéticos são aqueles que apresentam momentos de dipolo magnético intrínseco e não interagentes entre si. Em outras palavras, são aqueles materiais que apresentam uma magnetização nula na ausência do campo magnético. Porém, a aplicação de um campo externo  $\vec{H}$  tende a alinhar seus dipolos na direção deste campo gerando um momento magnético  $M$ , pois esta orientação é energeticamente favorecida. Assim que o campo externo é removido, estes materiais tornam a apresentar magnetização nula (AUGUSTUS; RIBEIRO, 2000). No caso dos materiais ferromagnéticos, ao contrário dos paramagnéticos, os momentos de dipolo magnéticos intrínsecos são interagentes, o que faz com seus momentos de dipolo magnético fiquem permanentemente alinhados, independentemente da existência de um campo externo  $\vec{H}$  (SINNECKER, 2000).

O antiferromagnetismo assim como o ferromagnetismo surge do alinhamento dos *spins*, sendo que, neste caso, o alinhamento ocorre em direções opostas, fazendo com que os momentos vizinhos se anulem. Este comportamento é semelhante ao de um material paramagnético, porém a magnetização  $M$  possui uma grandeza muito superior em materiais ferromagnéticos, tendo uma relação linear com o campo  $\vec{H}$  (AUGUSTUS; RIBEIRO, 2000).

Por fim, existem os materiais chamados de ferrimagnéticos que se assemelham ao comportamento dos ferromagnéticos, com a distinção de que a intensidade dos seus *spins* é desproporcional, gerando um somatório não nulo dos seus momentos magnéticos. Como consequência, um ferrimagneto apresenta uma magnetização permanente (OLIVEIRA, 2005).

O comportamento magnético de um determinado material pode ser definido analisando sua curva de histerese, como na Figura 11

Figura 11- Ciclo de histerese de um material magnético com características ferromagnéticas.



Fonte: RIBEIRO (2000).

Na Figura 11 tem-se a representação gráfica do comportamento magnético de um determinado material. Quando um campo magnético  $M$  é aplicado em um material inicialmente desmagnetizado, este seguirá conforme o caminho da linha pontilhada até um valor máximo, conhecido como magnetização de saturação ( $M_s$ ). Invertendo o sentido do campo, a magnetização vai decrescendo chegando a um valor conhecido como magnetização remanente ( $M_r$ ), que é uma magnetização que permanece no material de forma residual. Invertendo

novamente o campo aplicado, o  $Mr$  atinge valores menores que  $M$ , até um valor onde o campo magnético aplicado é nulo, conhecido como campo coercivo ( $H_c$ ) (AUGUSTUS; RIBEIRO, 2000).

Materiais paramagnéticos possuem um valor de  $Mr$  e  $H_c$  baixos, ou seja, não permanecem magnetizados quando não estão mais expostos ao campo magnético aplicado. Sua curva de histerese apresenta característica de uma linha única, pois os dois sentidos do ciclo tornam-se coincidentes. Já na curva observada na Figura 3, o comportamento observado é de um material ferromagnético, onde a  $Mr$  permanece elevada mesmo na ausência de um campo magnético.

### 2.2.2.3 Síntese de Nanopartículas Magnéticas de Óxidos de Ferro

As NPM podem ser sintetizadas a partir de uma grande variedade de composições e fases, incluindo metais puros como Fe, Co e Ni; óxidos metálicos como o  $Fe_3O_4$  e  $\gamma-Fe_2O_3$ ; ferritas como  $MFe_2O_4$  ( $M=Cu, Ni, Mn, Mg, etc$ ); e ligas metálicas como FePt e CoPt (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010). Dentro deste grupo, as partículas com base em óxidos metálicos como a magnetita ( $Fe_3O_4$ ), a maguemita ( $\gamma-Fe_2O_3$ ) e a hematita ( $\alpha-Fe_2O_3$ ) são as mais utilizadas, pois, embora apresentem propriedades magnéticas inferiores às NPM obtidas do Fe e Co puros, possuem algumas vantagens, tais como uma melhor estabilidade oxidativa, compatibilidade em sistemas não aquosos, além de serem atóxicas. Dentre as partículas de óxidos de ferro citadas anteriormente, a magnetita é sem dúvida a mais utilizada como suporte enzimático (DRBOHLAVOVA *et al.*, 2009; NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013; SCHETTINO JR., 2009).

As NPM de óxido de ferro com uma superfície quimicamente apropriada podem ser utilizadas em uma grande variedade de aplicações *in vitro*, como agentes de contraste em ressonância magnética, reparações teciduais, imunoenaios, desintoxicação biológica de fluídos, liberação controlada de fármacos, terapias envolvendo hipertermia (CASTRO *et al.*, 2010; LAURENT *et al.*, 2008), separação celular e tecnologia enzimática (CAO *et al.*, 2012). Todas essas aplicações necessitam que a superfície das NPM seja recoberta por materiais especiais atóxicos e biocompatíveis, ou modificadas com grupos funcionais específicos permitindo sua ligação com fármacos, enzimas, proteínas, anticorpos e nucleotídeos (LAURENT *et al.*, 2008).

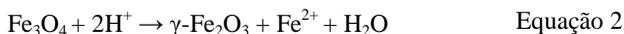
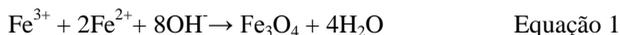
Assim, como em outros tipos de materiais inorgânicos, espera-se que nos processos de síntese das NPM, o produto obtido apresente

uniformidade em relação ao tamanho e morfologia das partículas, que seja plausível de reprodutibilidade e que possua, ainda, propriedades controláveis através da manipulação dos parâmetros de processo. Devido ao reduzido tamanho das NPs, muitas destas características podem ser difíceis de obter. No entanto, o avanço tecnológico tem permitido que muitos dos problemas encontrados nestas metodologias sejam, aos poucos, solucionados (BRUCE *et al.*, 2004).

Existem hoje várias técnicas para a preparação de NPM, descritas em um grande número de trabalhos da literatura. Dentre os métodos mais populares, podem-se destacar: a coprecipitação, a microemulsão, a decomposição térmica, bem como os métodos solvotérmico, sonoquímico, hidrotérmico assistido por micro-ondas e de deposição química assistida por vapor (LAURENT *et al.*, 2008; SCHETTINO JR., 2009; WILLARD *et al.*, 2004). A seguir, serão descritos as principais metodologias adotadas para a síntese de NPM.

Coprecipitação: é o método de obtenção de NPs mais antigo e muito apreciado devido a sua simplicidade. Nesta técnica os precursores metálicos são inicialmente dissolvidos em um determinado solvente, adicionando um agente precipitante (geralmente uma base) para formar um sólido insolúvel. A reação ocorre em atmosfera inerte e à temperatura ambiente ou altas temperaturas (LAURENT *et al.*, 2008; WILLARD *et al.*, 2004).

As NPM de óxidos de ferro como a magnetita e a maguemita costumam ser preparadas seguindo este procedimento, a partir de uma mistura estequiométrica de sais ferrosos e férricos ( $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$ ). A completa precipitação das partículas de magnetita ocorre em uma faixa de pH compreendida entre 8 e 14, em uma atmosfera livre de oxigênio (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010; LAURENT *et al.*, 2008). A magnetita, produzida conforme a rota descrita na Equação 1, apresenta pouca estabilidade podendo ser facilmente oxidada. Assim, a magnetita pode ser transformada em maguemita pela presença de oxigênio, segundo a Equação 2 (LAURENT *et al.*, 2008).



A grande vantagem do método de coprecipitação gira em torno do elevado rendimento das partículas sintetizadas e sua

reprodutibilidade em larga escala. Adicionalmente, quando comparada com outros métodos, este tipo de síntese ocorre em temperaturas brandas e em um curto tempo reacional, além de não utilizar solventes químicos. Por fim, o processo possui, ainda, um baixo custo (WILLARD *et al.*, 2004; LAURENT *et al.*, 2008).

Embora as vantagens desta metodologia sejam bastante significativas, ela encontra barreiras em relação ao pouco controle do tamanho e formato das partículas produzidas, que são dependentes de fatores como pH, concentração do cátion metálico e tipo de agente precipitador (WILLARD *et al.*, 2004; LAURENT *et al.*, 2008).

Microemulsão: consiste na utilização de um sistema formado por duas substâncias imiscíveis (geralmente água e óleo) e um surfactante, formando uma solução isotópica e termodinamicamente estável. O surfactante possui como finalidade reduzir a tensão interfacial entre as duas substâncias da mistura, resultando em uma solução transparente. As gotas de água com tamanhos compreendidas na escala nanométrica atuam como um pequeno reator para a síntese nas NPM. Os reagentes contidos no interior destas nanogotas sofrem uma rápida coalescência, sofrendo precipitação e formando agregados. Esta técnica também é bastante simples em função dos reagentes e aparato experimental utilizado. Além disto, através da variação na concentração e razão molar entre as substâncias da mistura é possível controlar o tamanho das nanogotas e conseqüentemente o tamanho das partículas produzidas (LAURENT *et al.*, 2008; WILLARD *et al.*, 2004).

Decomposição térmica: este método, por sua vez, baseia-se na decomposição térmica de um precursor organometálico em solvente orgânico com alto ponto de ebulição na presença de um surfactante. Este método é bastante utilizado para a produção de partículas monodispersas, permitindo, também, um excelente controle de tamanho e morfologia das NPM através de controles reacionais, como razão molar entre os reagentes. Porém, a toxicidade dos solventes utilizados é um fator negativo do processo, limitando a aplicação das NPM em alguns usos biotecnológicos (LAURENT *et al.*, 2008; WILLARD *et al.*, 2004).

Método Solvotérmico: também conhecido como método hidrotérmico, permite a preparação de NPM e pós ultrafinos. As reações são realizadas em meio aquoso no interior de reatores ou autoclaves sob alta pressão (acima de 2000 psi) e temperatura (acima de 200°C). É um dos melhores métodos de síntese de NPM em relação ao crescimento de cristais de inúmeros tipos de materiais. Apesar de bastante versátil, a técnica apresenta como inconveniente uma cinética de reação lenta a

qualquer temperatura. Como alternativa, pode-se promover o aquecimento através de micro-ondas, aumentando a velocidade de cristalização em até duas ordens de grandeza (LAURENT *et al.*, 2008a; WILLARD *et al.*, 2004).

Método sonoquímico: neste método utiliza-se uma sonda de ultrassom operando em alta frequência para irradiar os precursores organometálicos ou em solução. As ondas formadas induzem a formação, crescimento e colapso das bolhas no líquido. Este processo permite a formação de grande quantidade de pós-amorfos, aglomerados e materiais porosos a partir dos precursores organometálicos. Devido a esta grande quantidade de material formado e ao baixo custo dos reagentes envolvidos no processo, torna-se bastante atrativo para aplicação industrial.

A lista de trabalhos encontrados descrevendo não só as metodologias apresentadas, mas também outras técnicas mais elaboradas que envolvem a combinação de dois ou mais métodos no mesmo processo é bastante extensa. A escolha da melhor metodologia a ser utilizada depende da avaliação das necessidades envolvidas em cada trabalho e dos objetivos traçados, selecionando, desta forma, os protocolos que melhor se adaptem a cada contexto.

### 2.2.2.4 Métodos de Estabilização e Funcionalização de Nanopartículas Magnéticas

Devido suas características físicas, quando expostas a condições ambientes as NPM podem rapidamente sofrer oxidação, causando modificações estruturais. A aglomeração natural das partículas formando grandes blocos também é um fator que dificulta suas aplicações. Além disto, a estabilização de suspensões coloidais magnéticas depende basicamente do equilíbrio entre as forças de repulsão e atração, sendo possível impedir a aglomeração e estabilizar sua superfície, trabalhando com suas forças eletrostáticas ou impedimentos estéricos (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010). Com o propósito de proteger as NPM destes fenômenos, algumas estratégias de estabilização de suas superfícies podem ser aplicadas.

Uma das estratégias mais abordadas para promover esta estabilização é a utilização de surfactantes, que previnem a oxidação das partículas pelo ar atmosférico. Surfactantes como o ácido esteárico, ácido eláidico e o ácido oleico podem ser utilizados (LU; RAMOS; FORCADA, 2007), sendo este último o mais aplicado para atingir este objetivo.

O uso de coberturas poliméricas é uma forma de estabilização bastante explorada. Dentre os polímeros naturais mais utilizados estão a quitosana (LI *et al.*, 2008); a gelatina (GAIHRE *et al.*, 2009), a goma arábica e a dextrana (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010). Já entre os polímeros sintéticos, os mais frequentemente citados são polietileno glicol, álcool polivinílico e alginato (LAURENT *et al.*, 2008).

As NPM podem ser produzidas através de diversos processos. No entanto, a sua utilização como suportes para a imobilização de enzimas só é possível mediante uma modificação química ou física de sua estrutura, etapa conhecida como funcionalização da NPM. Esta modificação pode ser feita inserindo grupos funcionais em sua superfície como aminas, hidroxilas e carboxilas, aumentando a afinidade das NPs com a água. Esta propriedade permite a interação das NPs com sistemas biológicos como enzimas, proteínas e aminoácidos (MAURICIO *et al.*, 2013).

Existem duas abordagens gerais para promover a funcionalização de uma NPM. A primeira é a adição de uma substância ligante na superfície da NPM, formando uma dupla-camada contendo os ligantes originais junto com o adicionado, recobrando a superfície da partícula. A segunda abordagem promove a troca dos ligantes originais da NPM por um ligante bifuncional contendo um grupo funcional capaz de formar ligações químicas fortes entre a superfície da NPM e a molécula que será imobilizada (FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).

Embora a maioria dos trabalhos encontrados na literatura apresente predominantemente a primeira abordagem, as metodologias que empregam a troca de ligantes apresentam um grande potencial. Em alguns casos, é possível atingir a estabilização e funcionalização da NPM simultaneamente (LEE *et al.*, 2009).

### 2.2.3 Imobilização de Lipases em NPM

O processo de imobilização de lipases em NPM envolve uma série de passos relacionados à preparação das partículas, à ativação do suporte e à inserção da lipase no suporte ou matriz polimérica, conforme descrito anteriormente neste capítulo. Um importante aspecto a ser observado durante o processo é o nível de interações superficiais entre a proteína e a partícula magnética. A capacidade de adsorção da enzima no suporte depende da ativação de ligações químicas tanto na superfície da proteína quanto na da partícula. Esta ativação ocorre através de um rearranjo dos átomos superficiais, proporcionando uma menor energia de ativação (NETTO; TOMA; ANDRADE, 2013).

Existem hoje inúmeros trabalhos descrevendo a imobilização de lipases em suportes magnéticos, envolvendo a combinação de diferentes tipos de suporte e protocolos de imobilização, sendo que algumas das mais relevantes estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1- Publicações aplicando micro e nanopartículas de magnetita para a imobilização de lipases.

<b>Micro-organismo produtor</b>	<b>Suporte</b>	<b>Método de imobilização</b>	<b>Aplicação</b>	<b>Referência</b>
<i>Pseudomonas cepacia</i> e <i>Candida antarctica</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /metiltrimetoxisilano	Encapsulamento	Resolução cinética da 2-pentilamina	(REETZ <i>et al.</i> , 1998)
<i>Candida cylindracea</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PMA-DVB	Ligação covalente	Hidrólise do azeite de oliva	(LIU <i>et al.</i> , 2005)
<i>Candida rugosa</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /P(HEMA-DMDAAC)	Adsorção e ligação covalente	Hidrólise do azeite de oliva	(YONG <i>et al.</i> , 2008)
<i>Candida rugosa</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /sílica/líquido iônico	Adsorção	Esterificação do ácido oleico	(JIANG <i>et al.</i> , 2009)
Lipase pancreática	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / poli (GMA-MMA-DVA)	Ligação covalente	Síntese do acetato de hexila	(LEI <i>et al.</i> , 2009)
Lipase pancreática	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -SDS	Adsorção	Hidrólise do azeite de oliva	(LEE <i>et al.</i> , 2009)
Lipase pancreática	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -ABS	Adsorção	Hidrólise do azeite de oliva	(PONVEL <i>et al.</i> , 2009)
<i>Burkholderia cepacia</i>	APTS-NPM	Adsorção e ligação covalente	Resolução cinética de (RS)-1-(fenil) etanol	(REBELO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Burkholderia cepacia</i>	APTS-NPM	Adsorção e ligação covalente	Resolução cinética do (RS)-2-bromo-1-(fenil) etanol	(ANDRADE <i>et al.</i> , 2010)
<i>Candida rugosa</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /polidopamina	Ligação covalente	Hidrólise da tributirina	(REN <i>et al.</i> , 2011)
<i>Candida rugosa</i>	NPM/sílica e esporopoleína	Encapsulamento	Resolução cinética do	(YILMAZ; SEZGIN;

			(R,S)-metil éster de naproxeno	YILMAZ, 2011)
<i>Candida rugosa</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /P(HEMA–DMDAAC)	Adsorção e ligação covalente	Hidrólise do azeite de oliva	(LIU <i>et al.</i> , 2011)
<i>Burkholderia sp. C20</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> / sílica	Adsorção	Síntese de biodiesel	(TRAN; CHEN; CHANG, 2012)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Adsorção	Resolução cinética do 2-octanol	(XUN <i>et al.</i> , 2012)
<i>Candida antartica</i>	mCLEAs	Cross-linking	Síntese de biodiesel	(CRUZ-IZQUIERD O <i>et al.</i> , 2014)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /PEI	Adsorção e ligação covalente	Síntese do pentanoato de etila	(KHOABI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /PEI-M	Adsorção	Síntese do pentanoato de etila	(MOTEEVAL IZADEH <i>et al.</i> , 2015)
<i>Candida antartica</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /poli (ureia-uretano)	Encapsulamento	Síntese de etil oleato, geranyl oleato e geranyl propionato	(CHIARADI A <i>et al.</i> , 2016)
<i>Candida rugosa</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> .MCM-41	Ligação covalente	Interesterificação do óleo de soja e gordura de porco	(XIE; ZANG, 2016)
<i>P. cepacia</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /polidopamina	Ligação covalente	Síntese de biodiesel	(ANDRADE <i>et al.</i> , 2016)

Um dos primeiros trabalhos relatando o uso de NPM para a imobilização de lipases foi descrito por Reetz *et al.* (1998), onde a lipase foi encapsulada na NPM em um material hidrofóbico derivado do trimetilmtoxissilano através de um processo sol-gel. O derivado enzimático imobilizado foi testado na resolução cinética da pentilamina, mostrando uma atividade hidrolítica 3.3 vezes superior do que a solução

contendo a enzima livre, em reações experimentais idênticas, e resolução cinética com excesso enantiomérico de 97-99%.

O método de encapsulamento foi abordado por Yilmaz, Sezgin e Hilmaz (2011) e Chiaradia *et al.* (2016). A lipase de *Candida rugosa* foi encapsulada por Yilmaz, Sezgin e Hilmaz (2011) em um suporte inerte preparado através de policondensação com tetraetoxisilano (TEOS) e octiltrietoxisilano (OTES), juntamente com a magnetita. O uso da esporopoleína como aditivo na síntese também foi investigado. O derivado imobilizado foi testado na resolução cinética do (R,S)-metil éster de naproxeno e os melhores resultados foram obtidos para o suporte contendo a esporopoleína, com uma alta resolução cinética ( $E \geq 400$ ) em comparação com a enzima livre ( $E = 166$ ) e excesso enantiomérico de aproximadamente 98% para o S-naproxen.

Mais recentemente, Chiaradia *et al.* (2016) estudou o processo de encapsulamento da lipase B de *Candida antarctica* em um nanocompósito de magnetita e poli (ureia-uretano) obtido por polimerização interfacial em miniemulsão. O derivado enzimático foi aplicado na síntese dos etil oleato, geranil oleato e geranil propionato obtendo rendimentos superiores a 85% em todas as condições estudadas, demonstrando que o processo de encapsulamento não interfere no acesso do substrato ao sítio ativo da enzima, que permanece preservado após o processo de polimerização.

Suportes de NPM funcionalizados com sílica são alguns dos mais utilizados, principalmente por apresentarem uma boa estabilidade e facilidade de preparação (BRUCE *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2010; TRAN; CHEN; CHANG, 2012). Um exemplo é o trabalho de Tran, Chen e Chang (2012), que avaliaram a síntese de biodiesel em reação de metanólise do azeite de oliva catalisada pela lipase de *Burkholderia sp. C20* imobilizada em magnetita funcionalizada com sílica, destacando o reuso do derivado enzimático imobilizado por até dez vezes.

Jiang *et al.* (2009) utilizaram as nanopartículas de magnetita revestidas com sílica, que foram adicionalmente suportadas em líquidos iônicos. A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada através de ligação covalente, com uma retenção de 6,3 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>suporte</sub>. A enzima manteve 92% de sua atividade inicial após cinco reusos enquanto a lipase nativa apresentou uma retenção de apenas 35%. Sob temperaturas de 80 °C, o biocatalisador manteve 60% de sua atividade inicial.

Xie e Zang (2016) utilizaram nanocompósitos de sílica e magnetita ricos em grupos silanol para a imobilização da lipase de *Candida rugosa*, para a aplicação na interesterificação do óleo de soja e gordura de porco. Embora a reação de interesterificação conduzida em

diferentes condições experimentais tenha produzido bons rendimentos em ésteres de ácidos graxos, os autores destacam que o derivado imobilizado não apresentou bons resultados ao ser reutilizado. No entanto, as características magnéticas do suporte facilitaram a recuperação do biocatalisador a partir do meio reacional, que possui uma alta viscosidade.

O uso de coberturas poliméricas nas NPM tem o intuito de funcionalizá-las, aumentar a estabilidade e diminuir a aglomeração característica das nanopartículas magnéticas. Esta abordagem é uma das mais estudadas e diferentes tipos de polímeros podem ser aplicados como revestimento, conforme descrito nos trabalhos de Khoobi *et al.* (2015), Lei *et al.* (2009), LIU *et al.* (2005 e 2011), Montevalizadeh *et al.* (2015), Ren *et al.* (2011) e Yong *et al.* (2008). Segundo Netto *et al.* (2013), os tipos de coberturas poliméricas diferem entre si em relação a extensão dos grupos hidroxila presentes em sua estrutura, e que ajudam a preservar a conformação da enzima.

Yong *et al.* (2008) sintetizaram microesferas de magnetita cobertas com ácido oleico, que foram posteriormente encapsuladas através da copolimerização do glicidil metacrilato (GMA), acetato de vinila (VA) e dimetacrilato de etilenglicol (EGDMA). A lipase de *Candida rugosa* foi imobilizada covalentemente na microesfera com caráter hidrofílico. Testes de reuso na transesterificação do azeite de oliva indicaram o uso do biocatalisador por até dez vezes, mantendo cerca de 80% de sua atividade hidrolítica inicial.

Liu *et al.* (2005) utilizou microesferas magnéticas recobertas por poli (metacrilato de metila-co-divinilbenzeno) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ - PMA-DVB) obtidas através de copolimerização na presença de um fluido magnético. As partículas produzidas modificadas com dimetilformamida foram aplicadas na imobilização da lipase de *Candida cylindrea*. O método, considerado pelos autores como econômico, apresentou ainda como vantagem a eliminação da etapa de funcionalização, uma vez que o suporte foi previamente enriquecido com grupos amino no momento da sua síntese.

A polidopamina, um polímero derivado da oxidação da dopamina e com propriedades adesivas, possui grupos ortodihidroxifel (catecol) e aminoácidos capazes de formar ligações com biomoléculas. Ren *et al.* (2011) fez uso de suportes de magnetita recoberta por polidopamina na imobilização da lipase de *Candida rugosa*, obtendo um derivado enzimático com uma boa estabilidade frente a pH extremos e temperaturas elevada. Em relação à reutilização do biocatalisador, o mesmo pode ser reutilizado por até 21 ciclos mantendo até 70% de sua

atividade hidrolítica avaliada na hidrólise da tributirina. No entanto, Andrade *et al.*, (2016) que também estudaram o suporte de magnetita/polidopamina na imobilização através de adsorção da lipase de *P. cepacia*, aplicando-o na reação de metanólise do óleo de soja, relatou a possibilidade de apenas 3 reutilizações sem perdas aparentes de atividade. Esta redução no número de reusos quando comparado os dois trabalhos pode ser atribuído ao efeito tóxico do metanol que pode afetar a estabilidade da lipase.

Liu *et al.* (2011) sintetizaram suportes de magnetita recobertos por poli (metacrilato de hidroxietila-co-cloreto de dimetilamonia) ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-P/HEMA-DMDAAC}$ ) carregados positivamente e funcionalizados com grupos epóxidos. Nesta técnica, as partículas foram sintetizadas em três etapas, sendo primeiramente sintetizadas as NPM na presença de tetraetóxissilano, seguida da copolimerização com HEMA e DMDAAC. Como as hidroxilas presentes no  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-P/HEMA-DMDAAC}$  não são capazes de reagir com a lipase, uma terceira etapa de ativação foi conduzida através da reação com epóxi-cloro-propano. A lipase de *Candida rugosa*, imobilizada por adsorção eletrostática e covalentemente, foi imobilizada no suporte com uma alta carga de proteínas ( $68 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$ ) retendo até 60% da atividade inicial. A grande retenção de enzimas no suporte foi apontada como vantagem em relação a demais técnicas que permitem a imobilização de uma menor massa de proteínas e foi apontado como consequência da elevada concentração de grupos epóxidos inseridos na etapa de ativação.

Motevalizadh *et al.* (2015) e Khoobi *et al.* (2015) estudaram a síntese e aplicação de suportes de magnetita com coberturas de polietilenoamina ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI}$ ), puros ou associados aos íons metálicos  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Pd}^{2+}$  ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-PEI-M}$ ). Os melhores resultados foram obtidos para o suporte associado aos íons divalentes, apresentando um aumento na capacidade de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) em relação ao suporte sem a presença de íons, além de um bom rendimento experimental na reação de síntese do aroma artificial de maçã (pentanoato de etila).

No trabalho realizado por Lei *et al.* (2009), microesferas magnéticas foram preparadas através da reação de polimerização dos monômeros glicidil metacrilato (GMA), ácido metacrílico (MMA) e divinilbenzeno (DVB) na presença de partículas de  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  recobertas com ácido oleico. A lipase pancreática imobilizada nas microesferas de poli(GMA-PVA-MMA) através da ligação covalente entre a enzima e os grupos epóxidos superficiais do suporte, com capacidade de carga de  $39 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$  com uma atividade recuperada de 63%.

As NPM podem ser utilizadas sem a necessidade de uma cobertura polimérica, sendo que neste caso a funcionalização da partícula é realizada através da modificação de sua superfície. Como exemplo de aplicação deste protocolo, Rebelo *et al.* (2010) e Andrade *et al.* (2010) estudaram o suporte de magnetita funcionalizada com 3-aminopropiltrimetoxisilano (APTS), gerando partículas com APTS em sua superfície. A fim de comparar diferentes metodologias, um comparativo entre os processos de imobilização via adsorção, entrecruzamento com glutaraldeído, e entrecruzamento com carboxibenzaldeído da lipase de *Burkholderia cepacia* foi realizado. Os derivados enzimáticos foram aplicados na resolução cinética de (RS)-1-(fenil) etanol e (RS)-2-bromo-1-(fenil) etanol do através de reações de transesterificação, obtendo os (R)-ésteres e os (S)-álcoois e excesso enantiomérico superior a 99% em ambas as reações, o que corresponde a um perfeito processo de resolução cinética enzimática (conversão 50%,  $E > 200$ ). O melhor resultado foi obtido a partir da metodologia utilizando o glutaraldeído, promovendo até oito reutilizações do biocatalisador.

A modificação estrutural da magnetita também através da substituição de ligantes em duas etapas pode ser realizada como alternativa ao uso de coberturas com o intuito de funcionalizá-las. Um exemplo de modificação de superfícies através desta metodologia foi descrita nos trabalhos de Lee *et al.* (2009) e Ponvel *et al.* (2009) que desenvolveram um processo envolvendo duas etapas para produzir NPM funcionalizadas com surfactantes. Na primeira etapa, partículas funcionalizadas com oxalato de amônio foram sintetizadas, sendo estes grupamentos substituídos por outros grupos funcionais como o lauril sulfato de sódio (SDS) e o sulfonato de alquilbenzeno linear (ABS), promovendo, desta forma, as etapas de estabilização e funcionalização concomitantemente. A lipase pancreática foi imobilizada nas nanopartículas hidrofóbicas de magnetita funcionalizadas através de adsorção, demonstrando uma alta estabilidade em diferentes condições de pH e temperatura.

Xun *et al.* (2012) imobilizaram a lipase de *Pseudomonas fluorescens* através de adsorção hidrofóbica. As nanopartículas de magnetita utilizadas como suporte foram tratadas somente com ácido oleico como agente estabilizador. O biocatalisador apresentou uma alta atividade enzimática e enantiosseletividade na resolução cinética do 2-octanol através de reação de transesterificação ( $E = 71,5$ ), obtendo o (S)-2-octanol com elevada pureza ótica (99 %). A metodologia aplicada foi

simples e de fácil execução, permitindo ainda o reuso do biocatalisador por cinco vezes.

Outra alternativa é a formação de CLEAS, que são agregados enzimáticos entrecruzados (*cross-linked enzyme aggregates*), e podem ser associados às propriedades magnéticas aliando as vantagens desta técnica de imobilização à facilidade de recuperação e reutilização oferecida pelas NPM. No trabalho desenvolvido por Cruz-Izquierdo *et al.*, (2014), agregados foram formados pela lipase B de *Candida antarctica* reticulada de forma covalente à NPM com superfície funcionalizada com grupos  $-NH_2$ . As mCLEAs (CLEAs magnéticas) foram aplicadas na síntese de biodiesel a partir de óleos vegetais de soja, pinhão manso e camelina, além de óleos residuais. As conversões em ésteres foram de cerca de 80 %, em temperaturas de 30 °C após 24 h, aumentando para 92 % após 72 h. O catalisador pode ser reutilizado por até 10 ciclos consecutivos de 24 h sem perda significativa de atividade.

De uma forma geral, a comparação das metodologias abordadas nos trabalhos descritos não nos fornece uma melhor ou pior técnica, dados os diferentes tipos de lipases utilizadas, bem como suas respectivas aplicações. Porém, os estudos que descrevem o uso de coberturas poliméricas e imobilização através de ligação covalente são os mais representativos, apresentando alguns dos melhores resultados em relação à estabilidade e atividade recuperada dos derivados enzimáticos, quando comparado com outras metodologias. Técnicas que não necessitam o recobrimento das nanopartículas vêm sendo bastante estudadas, permitindo, assim, a obtenção de suportes estáveis e funcionais.

### 2.2.4 Imobilização de $\beta$ -D- galactosidase em NPM

O processo de imobilização da enzima de  $\beta$ -D-galactosidase é, também, um tema em constante desenvolvimento. As metodologias descritas na literatura tratam do uso dos mais diversos tipos de materiais como suporte, como por exemplo, os suportes comerciais de agarose (epóxi, glioxil, amino e brometo de cianogênio) (PESELA *et al.*, 2003, 2007), quitosana (FACIN *et al.*, 2015; KLEIN *et al.*, 2013; URRUTIA *et al.*, 2014), sílica (LADERO *et al.*, 2001), e em resinas porosas como eupergit C (NAKKHARAT *et al.*, 2006) e duolite A568 (GÜRDAŞ; GÜLEÇ; MUTLU, 2012).

Embora o número de publicações referentes à imobilização das  $\beta$ -D-galactosidasas em suportes magnéticos seja inferior quando comparado com outras enzimas, como por exemplo, as lipases, esta

aplicação tem evoluído gradativamente. Em geral, a maioria dos trabalhos publicados utiliza como método de imobilização as técnicas de ligação covalente ou entrecruzamento, necessitando, assim, de um suporte magnético funcionalizado com grupos químicos capazes de promover este tipo de interação, como o glutaraldeído ou grupos epóxidos.

Nanocompósitos com por partículas magnéticas e outros materiais como a quitosana e polímeros, são alguns dos mais aplicados. A Tabela 2 apresenta uma compilação dos principais trabalhos publicados ao longo dos últimos 10 anos descrevendo o uso deste tipo de suporte.

Neri *et al.*, (2008) descrevem um procedimento simples e barato para sintetizar um suporte magnético para a imobilização da  $\beta$ -D-galactosidase de *Kluceroomyces lactis*. Inicialmente foram sintetizadas esferas constituídas por uma mistura de álcool polivinílico (PVA) e polisiloxano (POS) através do método sol-gel, que posteriormente foram maceradas e adicionadas no processo de síntese da magnetita por coprecipitação dos íons de  $Fe^{2+}$  e  $Fe^{3+}$  (MPOS-PVA). O nanocompósito foi ativado com glutaraldeído e a enzima imobilizada através de entrecruzamento. O derivado enzimático apresentou temperatura ótima de 50°C. O derivado foi aplicado na hidrólise de lactose a partir de leite, podendo ser reutilizado durante 20 ciclos mantendo até 50% de sua atividade inicial. O mesmo grupo de pesquisadores realizou um trabalho subsequente, substituindo o PVA-POS por um revestimento de polianilina (MAV-PANI) utilizando-o para a imobilização da  $\beta$ -D-galactosidase de *Aspergillus orizae*. O derivado enzimático MAV-PANI apresentou características similares ao da enzima livre, porém somando a facilidade de recuperação e reutilização como vantagens (NERI *et al.*, 2011).

Esferas de magnetita revestidas por quitosana também foram estudadas por diversos autores, sendo o nanocompósito mais aplicado até o presente momento, devido à facilidade de síntese das nanopartículas, baixo custo do material e caráter atóxico. Pan *et al.*, (2009) imobilizaram a de  $\beta$ -D-galactosidase de *Aspergillus oryzae* através de ligação covalente no suporte para a obtenção de GOS, atingindo rendimentos 35% mais elevados do que a reação conduzida com a enzima na sua forma livre. Já Zhang, Gao e Gao, (2010) avaliaram os efeitos do glutaraldeído para no entrecruzamento do derivado enzimático contendo a  $\beta$ -D-galactosidase imobilizada através de ligação covalente. Os derivados enzimáticos sintetizados foram

capazes de operar em uma faixa de temperatura de 10°C a mais do que a enzima livre.

Tabela 2- Publicações aplicando nanopartículas magnéticas para a imobilização de β-D-galactosidases.

Micro-organismo produtor	Suporte	Método de imobilização	Aplicação	Referência
<i>E. coli</i>	Nanoesferas de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /poli (GMA-MMA)	Ligação covalente	Hidrólise da lactose em reator de leito fixo	(BAYRAMO GLU; TUNALI; ARICA, 2007)
<i>Klyveromyces lactis</i>	mPOS-PVA	Entrecruzamento	Hidrólise da lactose	(NERI <i>et al.</i> , 2008)
<i>Aspergillus orizae</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /quitosana	Ligação covalente	Síntese de GOS	(PAN <i>et al.</i> , 2009)
(não informado)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /quitosana	Ligação covalente e entrecruzamento	Síntese de GOS	(ZHANG; GAO; GAO, 2010)
<i>Aspergillus orizae</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /polianilina	Entrecruzamento	Síntese de GOS	(NERI <i>et al.</i> , 2011)
<i>Klucерomyces fragilis</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /poli (GMA-EDGMA-HEMA)	Ligação covalente	Síntese de GOS	(LIU <i>et al.</i> , 2012)
<i>Thermotoga maritima</i>	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> modificada com epóxido	Ligação covalente	Hidrólise de lactose e síntese de GOS	(MARÍN-NAVARRO <i>et al.</i> , 2014)
(não informado)	Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /quitosana ativada com THP	Entrecruzamento através de THP	Síntese de GOS	(CHEN; DUAN, 2015)

No trabalho desenvolvido por Chen e Duan (2015), as nanopartículas de magnetita/quitosana (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CS) foram sintetizadas utilizando tripolifosfato de sódio (TPP) como agente gelificante. Devido aos efeitos tóxicos do glutaraldeído, os autores utilizaram alternativamente o tris(hidroximetil)fosfina (THP) como agente ligante na imobilização da β-D-galactosidase por entrecruzamento. Adicionalmente, a enzima também foi testada através do entrecruzamento direto na partícula Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-CS sintetizada com TPP.

Ambos os derivados imobilizados foram testados na produção de GOS, obtendo 50,5% de rendimento a partir de uma solução de lactose 36% (m/v). Embora a imobilização não tenha aumentado o rendimento de GOS comparado com a enzima livre, o THP ajudou a melhorar a estabilidade térmica da enzima.

Grupos epóxidos possuem afinidade com  $\beta$ -D-galactosidase de diferentes procedências, o que permite que partículas funcionalizadas através destes grupos sejam aptas para promover ligações covalentes (LIU *et al.*, 2012; MARÍN-NAVARRO *et al.*, 2014). Dentre os trabalhos citados, pode-se destacar a pesquisa de Liu *et al.*, (2012) que prepararam nanoesferas a partir da técnica de polimerização via emulsificação na ausência de emulsificantes, utilizando glicidil metacrilato (GMA), etileno glicol dimetacrilato (EGDMA) e metacrilato de hidroxietila (HEMA) na presença de magnetita. A  $\beta$ -D-galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* foi imobilizada covalentemente nas microesferas magnéticas de poli (GMA-EDGMA-HEMA) e utilizada para a produção de GOS. O derivado enzimático apresentou como vantagem uma boa manutenção da atividade catalítica, retendo até 81% de sua atividade após a utilização em 10 ciclos de reações de 4h a 30°C.

### 2.2.5 Imobilização de $\alpha$ -Quimotripsinas em NPM

As QM são algumas das hidrolases mais estudadas. Métodos de imobilização em diferentes materiais vêm sendo desenvolvidos, como por exemplo, utilizando quitosana, PMMA o suporte comercial de Eupergit C (MATEO *et al.*, 2000), acetato de celulose (KUMARI *et al.*, 2016), sílica (SCHUABB; WINTER; CZESLIK, 2016). As QM imobilizadas vêm sendo aplicadas na síntese de proteínas, como biorreator para digestão de proteínas, separação cromatográfica e clivagem proteolítica da pepsina de porcina A (KUMARI *et al.*, 2016).

A imobilização de QM em NPM ainda é uma abordagem pouco investigada, sendo possível encontrar um número ainda pequeno de publicações a respeito. Na grande maioria dos trabalhos publicados, a busca pela reutilização da enzima aparece como objetivo principal. Na Tabela 3 estão listados alguns dos trabalhos encontrados na literatura.

Tabela 3- Publicações aplicando nanopartículas magnéticas para a imobilização de  $\alpha$ -quimotripsinas.

Suporte	Método de imobilização	Aplicação	Referência
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PAM (amino funcionalizado)	Ligação Covalente	-	(HONG <i>et al.</i> , 2006)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -PAM (carboxi funcionalizado)	Ligação covalente	Hidrólise da caseína	(HONG <i>et al.</i> , 2009)
Nanoesferas magnéticas de agarose	Ligação covalente	Clivagem proteolítica de enzimas digestivas	(SUSTROVA <i>et al.</i> , 2009)
$\gamma$ -Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Ligação covalente	Síntese de oligopeptídeos em solvente orgânico	(XIN; SI; XING, 2010)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /quitosana	Ligação covalente	-	(JU <i>et al.</i> , 2012)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Ligação covalente	-	(DISHLYUK; NOVOSELOVA; ROZALYONOK, 2013)
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> /Au	Ligação covalente	-	(KAMAL AHMADI; VOSSOUGH, 2013)

Hong *et al.* (2006 e 2009) escolheram a QM como modelo para estudar a ligação covalente em nanogéis magnéticos de poliacrilamida (PAM) aminados e carboxi funcionalizados através da reação química de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) a hidroxisucinamida (NHS). As condições ótimas de imobilização foram avaliadas em relação ao tempo, pH e razão molar entre enzima e os nanogéis magnéticos. No nanogel aminado os valores de pH baixos ajudaram na imobilização e uma perda de atividade foi observada após a imobilização, apresentando uma atividade recuperada de 59 % em relação a enzima livre, apresentando uma boa estabilidade e reusabilidade. Já nos nanogéis carboxi funcionalizados a atividade do derivado enzimático foi de 82 %, mostrando que esta estratégia de ativação foi mais promissora.

Sustrova *et al.* (2009) estudaram um processo simples de preparação de fosfoproteínas proteolíticas a partir de proteínas ricas em aminoácidos, através da imobilização da QM em nanopartículas

magnéticas de agarose. A imobilização resultou em um derivado enzimático mais estável termicamente, sendo possível sua reutilização por até doze vezes sem perdas aparentes de atividade.

Um extenso trabalho foi realizado por Xin, Si e Xing (2010) aplicando nanopartículas de maguemita e magnetita na imobilização de diferentes tipos de proteases, incluindo a QM, através de três metodologias distintas, envolvendo ligação covalente diretamente nas partículas e a utilização de tiofeno e triazol como agentes ligantes. No caso da QM, foram obtidos bons resultados tanto através da ligação direta quanto com o uso de tiofeno. Já as maguemitas, por possuírem um menor tamanho de partículas e conseqüentemente maior área superficial, mostraram-se melhores que as magnetitas. Os autores destacaram como a principal vantagem da imobilização a fácil recuperação do biocatalisador e a capacidade de reutilização por até cinco ciclos.

A reutilização do biocatalisador, um dos principais objetivos dos processos de imobilização, foi estudada por Ju *et al.* (2012). Para tal objetivo a QM foi imobilizada em NPM revestidas com quitosana obtendo 60 % da atividade catalítica inicial após reutilização em doze ciclos seguidos, o que representa uma boa estabilização da enzima através da imobilização.

Em relação à estabilidade do derivado enzimático, Dishlyuk, Novoselova e Rozalyok (2013) relataram um aumento significativo no derivado enzimático de QM imobilizada em NPM modificadas com grupos amino. Após 25 dias de estocagem em solução tampão 0,1 M, pH 7,4 e sob temperaturas de em torno de 4 °C o derivado apresentou uma perda de 20 % de sua atividade. Em contrapartida, a enzima livre armazenada nas mesmas condições apresentou uma perda total da atividade após 20 dias.

No decorrer das últimas décadas, a aplicação de nanopartículas como transportadores proteicos abriu novas possibilidades na área de aplicações biomédicas. Neste âmbito, a principal preocupação é a alteração na atividade biológica da proteína imobilizada frente às possíveis alterações conformacionais na superfície do transportador, segundo relatado por Kamal Ahmadi e Vossoughi (2013). Os autores investigaram estes parâmetros na QM, imobilizando-a em nanocompósitos de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-Au do tipo núcleo-casca. A imobilização foi realizada através de ligação covalente entre os grupos tiol e amino da enzima, e o átomo de Au do suporte. Os resultados mostraram que as estruturas secundária e terciária da enzima permaneceram praticamente inalteradas na superfície do suporte. No entanto houve uma diminuição

da atividade da enzima em 30%, indicando possíveis mudanças conformacionais.

### 2.3 COIMOBILIZAÇÃO DE ENZIMAS

Sendo a coimobilização de enzimas um dos temas unificadores dos capítulos desta tese, a análise de alguns trabalhos publicados envolvendo não somente o uso de nanopartículas magnéticas como suporte, mas também outros tipos de materiais merecem uma especial atenção. Muitas aplicações em química analítica e bioprocessos requerem ações coordenadas de múltiplas enzimas para catalisar uma sequência de reações específicas. Um exemplo são as etapas de liquefação e sacarificação do amido, onde primeiramente o amido é hidrolisado em oligossacarídeos solúveis e para serem convertidos em glicose na sequência. Com o objetivo de realizar estas duas etapas em um único sistema, Yang, Xu e Su (2010) estudaram um suporte composto por partículas de agarose magnéticas na coimobilização de glucoamilase e  $\alpha$ -amilase. As duas enzimas, atuando sinergicamente resultaram num maior rendimento em glicose do que em reações individuais. O uso de um suporte magnético permitiu a utilização de um sistema de agitação baseado na aplicação de campos magnéticos em diferentes intensidades, melhorando assim a transferência de massas entre as fases do substrato.

A indústria de alimentos é uma grande beneficiada de reações multicatalisadas, permitindo a economia de etapas na preparação, aumento da produtividade e uma melhor qualidade dos produtos. Neste âmbito, Sojitra, Nadar e Rathod (2016) desenvolveram um biocatalisador trienzimático composto pelas enzimas  $\alpha$ -amilase, pectinase e celulase imobilizadas simultaneamente em nanopartículas magnéticas aminofuncionalizadas. O catalisador multifuncional teve como objetivo atuar na etapa de clarificação de sucos de frutas, uma vez que os maiores problemas associados à qualidade destas bebidas refere-se à presença de resíduos de polissacarídeos como amido, pectina e celulose. O biocatalisador trienzimático demonstrou uma boa estabilidade frente aos parâmetros reacionais, podendo operar em uma faixa de temperatura entre 50-70 ° C e pH 3-6. As enzimas imobilizadas retiveram até 75 % da atividade recuperada, mesmo após a reutilização em oito ciclos consecutivos. Os sucos de frutas analisados obtiveram uma redução de turbidez entre 40-50 % após 150 min de tratamento.

A coimobilização de enzimas é uma ferramenta de grande utilidade na fabricação de biossensores, conforme descrito por Marciello

*et al.* (2014). Neste trabalho, os autores desenvolveram um biossensor químérico baseado na coimobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* (RML) e anticorpos, em nanopartículas magnéticas. A estratégia adotada foi imobilização da lipase em nanopartículas hidrofóbicas que serviram como um elemento chave na orientação e imobilização covalente da imunoglobulina G (HigG) a partir da lipase previamente modificada em estado sólido conforme proposto anteriormente por Fernandez-Lorente *et al.* (2008). Uma das vantagens relacionadas à metodologia proposta foi a reversibilidade da ligação iônica entre a lipase e o suporte, que permite a recuperação e regeneração das partículas magnéticas ao final do ciclo de vida do biossensor.

Um recente trabalho publicado por Peirce *et al.* (2016) propôs uma metodologia para a coimobilização de enzimas a fim de resolver a questão de estabilidade geral do biocatalisador. Um dos grandes problemas relacionados à coimobilização de múltiplas enzimas em um mesmo suporte refere-se às diferenças de estabilidade entre elas. O biocatalisador está sujeito as condições da enzima menos estável e a um protocolo de imobilização que seja adequado a todas as proteínas envolvidas no processo, o que é muito difícil de ser ajustado. Neste trabalho, os autores propuseram a imobilização da lipase de *Candida antarctica* (CALB) em suportes de octil agarose (OC), seguido do recobrimento deste derivado com polietilenoimina (PEI). A modificação do derivado com OC-CALB-PEI não alterou a estabilidade da lipase, permitindo assim a coimobilização da  $\beta$ -D-galactosidase de *Aspergillus oryzae* ( $\beta$ Gal) através de intercâmbio iônico. Adicionalmente, a  $\beta$ Gal pode ser desorvida com 300 mM de NaCl quase que totalmente, mantendo o derivado OC-CALB-PEI estável após todos esses tratamentos e permitindo o seu reuso após a inativação da  $\beta$ Gal. Este protocolo, semelhante a alguns dos objetivos tratados nesta tese, pode ser utilizado por praticamente qualquer tipo proteína capaz de interagir com a lipase e através de outros mecanismos além do intercâmbio iônico.

Embora a coimobilização de enzimas seja uma ferramenta chave para a ampliação do uso desses biocatalisadores em processos industriais, ainda não se é possível encontrar metodologias de simples execução e que possam ser aplicadas a diferentes grupos de enzima. Assim sendo, a investigação de novos métodos e protocolos para a coimobilização de enzimas, bem como a aplicação de novos materiais como suporte, ainda se fazem necessários.



## 3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE MAGNETITA HIDROFÓBICAS

### 3.1 INTRODUÇÃO

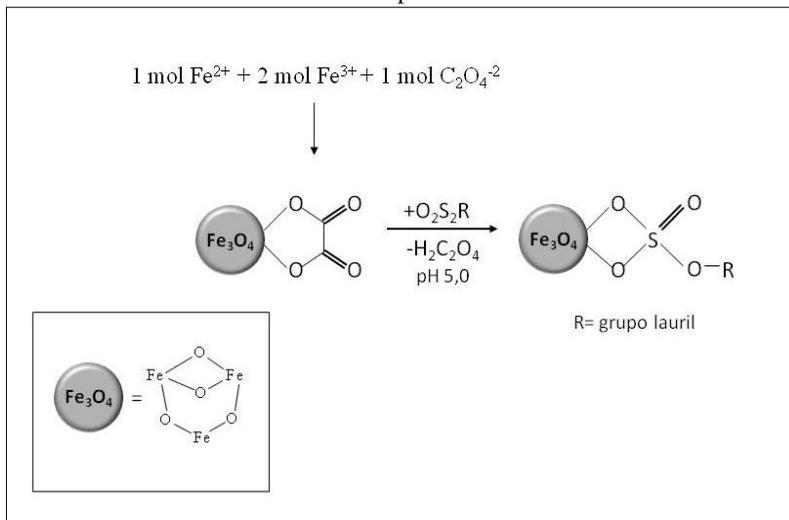
Conforme discutido no Capítulo II, a síntese de nanopartículas magnéticas pode ser realizada através de diferentes metodologias. Neste trabalho, optou-se por utilizar o método de coprecipitação de íons de ferro, segundo metodologia descrita primeiramente por Tie *et al.* (2006) e modificada por Lee *et al.* (2009).

O princípio do método adotado baseia-se na síntese de nanopartículas de magnetita através de duas etapas, onde primeiramente é produzida uma partícula de magnetita funcionalizada com oxalato, que, em um segundo momento, é substituído por outros grupos funcionais de interesse. Esta substituição pode ser realizada a partir de diversos grupos funcionais, como por exemplo aminoácidos (TIE *et al.*, 2006), sulfonato de alquilbenzeno (PONVEL *et al.*, 2009) e lauril sulfato de sódio, sendo este último o grupo substituinte selecionado para realizar a funcionalização das nanopartículas produzidas. Segundo os autores, este procedimento ocorre conforme o mecanismo proposto na Figura 12.

O SDS é um surfactante aniônico que possui uma extremidade polar formada por um grupo sulfato e outra extremidade praticamente apolar formada por um grupo alquila linear de doze carbonos. A aplicação deste composto na funcionalização do suporte tem como função atuar como um “espaçador” entre a superfície da partícula e da lipase, além de atenuar possíveis mudanças conformacionais causadas pela ligação direta entre o suporte e a enzima. Espera-se que a enzima, desta forma, se ligue através de suas zonas hidrofóbicas à cadeia carbônica também hidrofóbica do SDS através da ativação interfacial (LEE *et al.*, 2009).

Embora existam outras metodologias bastante estudadas para a síntese de magnetita, a escolha deste método deveu-se à simplicidade do processo, que garante etapas de funcionalização e estabilização das nanopartículas em uma única etapa, neste caso, a funcionalização com SDS. O baixo custo do processo também foi levado em conta nesta escolha, considerando que 10 mg da NPM-SDS preparada segundo a metodologia escolhida, possui um custo aproximadamente dez vezes menor do que o mesmo produto obtido comercialmente com características similares.

Figura 12- Mecanismo proposto para a reação de síntese da NPM-SDS em duas etapas.



Fonte: adaptado de Lee *et al.*, (2009).

Tendo em vista a aplicação deste material como um suporte para a imobilização e coimobilização de enzimas, o conhecimento da natureza química e da superfície do material sintetizado representa uma etapa de grande importância para a determinação do tipo de interação entre o suporte inorgânico e as enzimas estudadas. Desta forma, neste capítulo serão apresentados os resultados referentes às etapas de síntese das nanopartículas de magnetita modificadas superficialmente com SDS e a caracterização físico-química deste material através de técnicas de difração de Raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier pelo método ATR (FTIR-ATR), magnetização da amostra vibrante (MAV), área superficial, volume médio dos poros e determinação do potencial zeta.

### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) pelo método de coprecipitação dos íons de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  funcionalizadas com oxalato;

- Modificar os nanocompósitos de magnetita-oxalato com lauril sulfato de sódio obtendo nanopartículas magnéticas com caráter hidrofóbico;
- Caracterizar as nanopartículas hidrofóbicas em relação as suas características superficiais, microestruturais e de composição química.

### 3.2 MATERIAS E MÉTODOS

#### 3.2.1 Materiais

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

#### 3.2.2 Métodos

##### 3.2.2.1 Síntese das Partículas de Magnetita Funcionalizadas com SDS (NPM-SDS):

As nanopartículas de magnetita funcionalizadas com SDS (NPM-SDS) foram sintetizadas a partir de metodologia descrita inicialmente por Lee *et al.* (2009), através da coprecipitação dos íons  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$  em duas etapas. Primeiramente, 11 g de sulfato de ferro II e 5,65 g de oxalato de amônio foram adicionados em 100 mL de água destilada, agitando a suspensão até a total dissolução dos sais, formando o complexo  $\text{FeC}_2\text{O}_5$ . Após, 16 g de sulfato de ferro III foi adicionado a esta suspensão e a mistura final foi aquecida até 75 °C, realizando a desoxigenação do meio reacional com  $\text{N}_2$ . Com a temperatura estabilizada, o pH foi ajustado com hidróxido de amônio 32 % (v/v) até atingir um pH 9,0, necessário para a total precipitação das partículas de magnetita. A suspensão final foi agitada durante 1h a 1200 rpm e ao término deste tempo as nanopartículas foram separadas do meio reacional com o auxílio de uma barra magnética e lavadas abundantemente com água destilada. As nanopartículas sintetizadas nesta primeira etapa foram chamadas NPM-OX.

Na segunda etapa, os íons dicarboxílicos provenientes do oxalato de amônio presentes na superfície da NPM-OX foram substituídos por lauril sulfato de sódio (SDS) preparando uma suspensão de magnetita em SDS na razão molar de NPM:SDS de 2:1, sob atmosfera de  $\text{N}_2$  e

pH 5,0. A solução foi mantida sob vigorosa agitação durante 24 h à temperatura de 75 °C. Por fim, as nanopartículas funcionalizadas com SDS foram separadas do meio reacional através do auxílio de uma barra magnética, lavadas com cinco porções de água destilada desoxigenada aquecida (60-65 °C) e liofilizadas até a total evaporação da água.

#### 3.2.2.2 Análise Estrutural e Morfológica

A análise morfológica das nanopartículas de NPM-SDS foi realizada através de técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e microscopia de transmissão eletrônica (MET), ambas realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME).

As análises de MEV foram realizadas em equipamento JSM-6390LV (JEOL) operando a 30 kV. As amostras analisadas foram preparadas fixando uma pequena quantidade de NPM-SDS em um *stub* metálico com fita adesiva de carbono e recobertas com uma fina camada de ouro.

As análises de MET foram realizadas em equipamento modelo JEM-1011 da (JEOL), operando a 100 kV. As amostras analisadas foram previamente preparadas com uma suspensão diluída contendo 100 mg de NPM-SDS em 10 mL de água destilada e mantida em banho de ultrassom durante 3 min em temperatura ambiente ( $25 \pm 1$  °C). Este procedimento foi realizado de forma a evitar a sobreposição e aglomeração das partículas, facilitando sua observação. Em seguida, uma alíquota de 10  $\mu$ L foi depositada em uma grade de cobre recoberta com filme de carbono/Formvar<sup>®</sup> de 200 mesh e 3,05 mm de diâmetro, e mantidas em temperatura ambiente durante 24h para a evaporação da água.

#### 3.2.2.3 Determinação dos Parâmetros Microestruturais

Através da técnica de difração de Raios-X (DRX) foram identificados a fase cristalina presente na magnetita bem como informações a respeito de sua estrutura e tamanho de partículas. A análise foi realizada em um difratômetro de Raios-X modelo Cad- 4 da marca Enraf-Nonious<sup>®</sup>. As amostras foram analisadas com uma variação angular de  $2\theta$  entre 0 e 90°, com passo de 0,02°, tempo de passo de 1 s, radiação CuK $\alpha$  (40 kV/30 mA) e comprimento de onda de 1,5406 nm. Este procedimento foi realizado na Central de Análises do Departamento de Química (UFSC).

O tamanho médio das partículas foi calculado segundo a correlação entre duas equações. A primeira equação, a Lei de Braag

(Equação 3), determina as condições para que ocorra uma interferência construtiva dos feixes espalhados pelos planos cristalinos, relacionando a ordem de difração ( $n$ ) comprimento de onda ( $\lambda$ ), o ângulo do feixe ( $\theta$ ) do raio-X incidente e a distância interplanar ( $d_{hkl}$ ).

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

Associando a equação de Lei de Braag com os índices de Miller ( $h,k,l$ ), que são as coordenadas dos planos cristalinos e o parâmetro de rede  $a$ , que determina o tamanho médio do cristalino. Para um sistema cúbico, esta relação é definida conforme a Equação 4:

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

#### 3.2.2.4 Determinação da composição química

A identificação dos principais grupamentos funcionais bem como as ligações presentes nos suportes sintetizados foram realizadas através da análise de espectros de absorção obtidos em um espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier através de um sistema de refletância total atenuada (FTIR-ATR) em espectrofotômetro modelo BX-Perkin Elmer® e detector DTGS. As amostras foram depositadas diretamente em um cristal de ATR de seleneto de zinco e analisada na região de comprimento de onda entre 600- 4000  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4 $\text{cm}^{-1}$ . A Técnica de ATR é própria para a análise de amostras em pó, pastas ou adesivos e consiste na deposição da amostra diretamente em um cristal óptico. As análises foram realizadas no *Instituto de Cerâmica y Vidrio* (CSIC, Madrid, Espanha).

#### 3.2.2.5 Determinação das propriedades magnéticas

As propriedades magnéticas das partículas produzidas foram determinadas através de ensaios de magnetização da amostra vibrante (MAV). As análises foram realizadas em magnetômetro da marca Magmet Systems®, modelo 3473-70 Electromagnet, operando com campos magnéticos entre -20 e 20 kOe pertencente ao Departamento de Física (LFFS) da Universidade Federal de Santa Catarina.

### 3.2.2.6 Determinação da área superficial, diâmetro e volume dos poros

A medida da área superficial e a porosidade das nanopartículas NPM-SDS foram determinadas através das isotermas de adsorção e dessorção do  $N_2$  à  $-196,15^\circ\text{C}$ , sob pressões de até 2 atm e pressões relativas ( $P/P_0$ ) inferiores a 0,3. As análises foram realizadas em um analisador de área superficial Nova 2200e - Quantachrome Instruments pertencente à Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões (URI). Para a realização da análise foi utilizada uma amostra de aproximadamente 100 mg de NPM-SDS. A área superficial, diâmetro e volume dos poros foram obtidos a partir do tratamento dos dados através do método de Brunauer, Emmett e Teller (BET) e Barrett, Joyner e Halenda (BJH), respectivamente (BARRETT; JOYNER; HALENDA, 1951; BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938).

### 3.2.2.8 Determinação do potencial zeta das nanopartículas NPM-SDS

O estudo das cargas superficiais das nanopartículas de NPM-SDS foi investigado através da determinação do potencial zeta com o intuito de conhecer parâmetros de estabilidade do material estudado.

A medida do potencial zeta foi realizada em equipamento Stabino<sup>®</sup>-Nano Flex System<sup>®</sup> (Particle Metrix) instalado no Laboratório de Controle de Processos do Departamento de Engenharia Química (UFSC). As amostras foram preparadas suspendendo uma pequena quantidade das amostras analisadas em água destilada e mantidas em um banho de ultrassom durante 3 min em temperatura ambiente para diminuir os efeitos de aglomeração das nanopartículas. O pH inicial das amostras foi ajustado em 11 através da adição de NaOH.

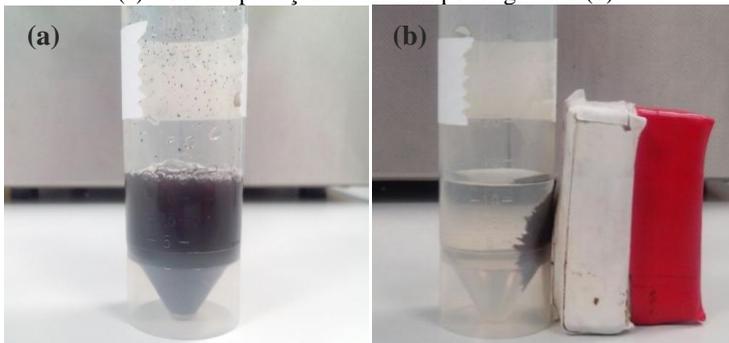
Para as análises, um volume de 3 mL da amostra foi introduzido em um cilindro acoplado de um pistão oscilante e a adição de HCl foi controlada através de uma bomba de precisão de titulação. O potencial elétrico na superfície das partículas foi medido conforme a variação de pH em uma faixa de 2-10.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Síntese da NPM-SDS

As nanopartículas de magnetita modificadas superficialmente com lauril sulfato de sódio (NPM-SDS) podem ser observadas na Figura 13, onde é possível visualizar o comportamento das mesmas diante da aplicação de um campo magnético.

Figura 13- Nanopartículas hidrofóbicas de magnetita (NPM-SDS) em suspensão (a) e sob a aplicação de um campo magnético (b).



**Fonte:** desenvolvido pela autora.

Durante a síntese das nanopartículas, o correto ajuste da temperatura foi um fator determinante para a formação do produto desejado. Quando a temperatura de precipitação das partículas foi menor do que 67 °C houve a formação de um produto de aspecto pastoso. O mesmo efeito foi observado por Faraji *et al.* (2010), que relataram que temperaturas de precipitação inferiores a 60 °C geralmente produzem um oxihidróxido hidratado amorfo, que, no entanto, pode facilmente ser convertido a maguemita a partir de tratamentos térmicos.

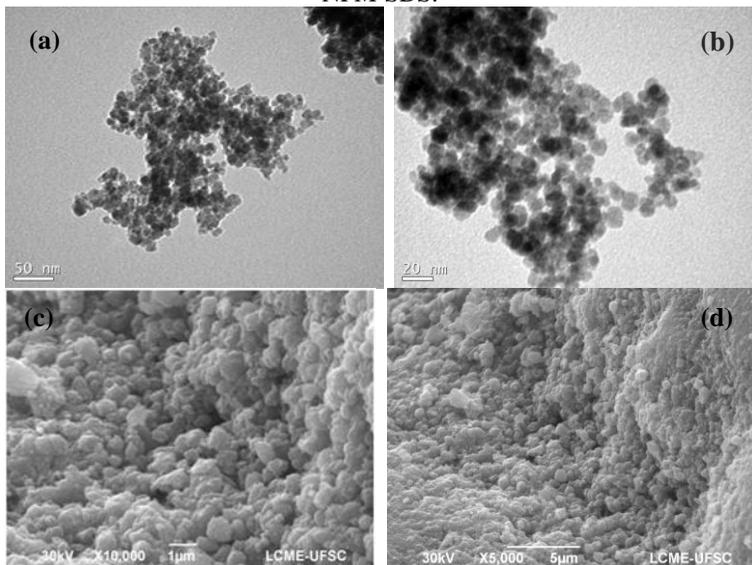
Fatores como a desoxigenação do meio reacional e a quantidade de  $\text{NH}_4\text{OH}$  adicionada na etapa de precipitação das partículas são fatores que devem ser rigorosamente acompanhados. A síntese das partículas na presença de oxigênio e a adição insuficiente de  $\text{NH}_4\text{OH}$  favorecem a formação de maguemita, que é um dos produtos de oxidação da magnetita. A eficiência destas etapas pode ser visualizada através da coloração das nanopartículas, que apresentam tonalidades característica para cada estado de oxidação, sendo a magnetita de cor preta e a

maguemita em tons castanho-avermelhado (BRUCE *et al.*, 2004; FARAJI; YAMINI; REZAEI, 2010).

### 3.3.2 Caracterização Físico-Química das NPM-SDS

As imagens obtidas por MET e MEV forneceram as informações referentes à morfologia das nanopartículas sintetizadas, e são apresentadas na Figura 14.

Figura 14- Imagens de MET (a-b) e MEV (c-d) obtidas das nanopartículas NPM-SDS.

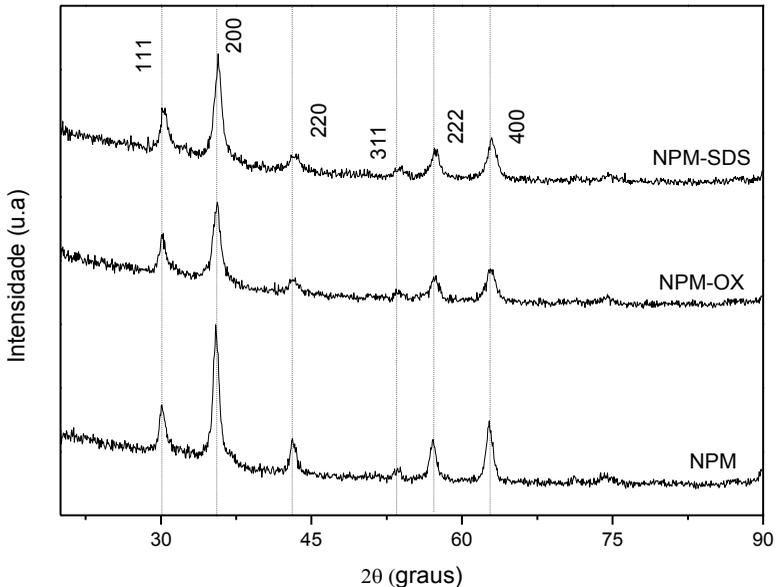


As análises de DRX forneceram os dados necessários para o cálculo do diâmetro médio das partículas sintetizadas conforme as Equações 3 e 4 e os cálculos referentes a esta análise estão apresentados em detalhes no ANEXO 1. O tamanho da NPM-SDS foi definido como  $5,5 \pm 0,3$  nm, estando de acordo com as análises de MET apresentadas, que sugerem partículas com tamanhos inferiores a 10 nm.

A estrutura cristalina das nanopartículas foi identificada através dos difratogramas apresentados na Figura 15, para as amostras de magnetita pura (NPM), NPM-OX e NPM-SDS. Os picos de difração ( $2\theta = 30, 35, 42, 53, 57$  e  $62$ ) presentes nas três amostras são característicos da magnetita com uma estrutura cúbica de face centrada, conforme comparação com o arquivo de dados JCPDS 01-088-0315. A

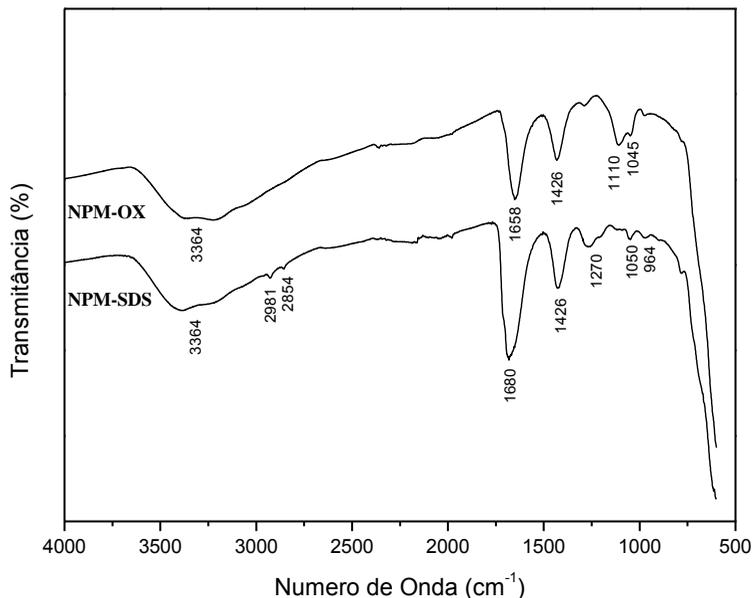
similaridade dos resultados obtidos para as três amostras confirma que a modificação dos ligantes em cada etapa de síntese não provocou mudanças na estrutura cristalina, além de indicar a ausência de quaisquer impurezas.

Figura 15- Difratograma de Raio-X para a magnetita pura (NPM), com oxalato (NPM-OX) e modificada com SDS (NPM-SDS), destacando os picos de difração em cada amostra.



A investigação da estrutura química e eficiência da etapa de substituição de ligantes foram realizadas através da técnica de FTIR-ATR. Os espectrogramas obtidos para as partículas NPM-OX e NPM-SDS são apresentados na Figura 16, comparando os resultados de ambas as amostras. No espectrograma da partícula NPM-OX, a vibração entre os estiramentos assimétricos e simétricos dos ânions dicarboxílicos ( $\text{-CO}_2^-$ ) presentes no oxalato podem ser vistos nos comprimentos de onda de  $1653$  e  $1426\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente. Esta região pode ser visualizada nos espectrogramas de ambas as amostras, sendo que para o SDS o segundo pico aparece um pouco deslocado em  $1680\text{ cm}^{-1}$  pela influência dos grupos fosfatos, indicando que não houve uma total substituição dos ânions oxalato por SDS. Nos comprimentos de onda de  $1110$  e  $1045\text{ cm}^{-1}$  tem-se os picos referentes ao estiramento das ligações entre C-C e C-O do oxalato (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

Figura 16- Espectro de FTIR das partículas de NPM-OX (magnetita funcionalizada com oxalato) e NPM-SDS (magnetita modificada com SDS).

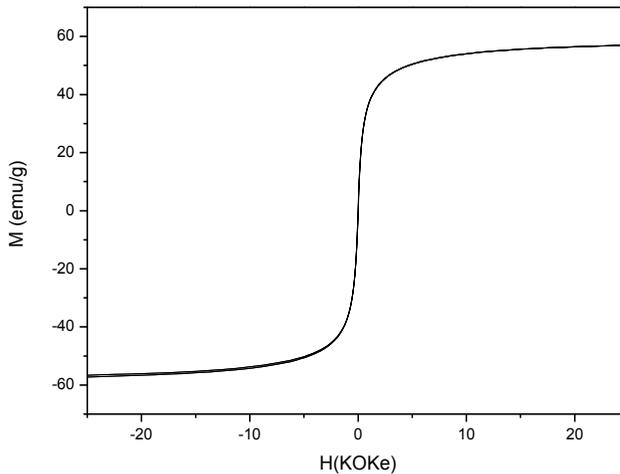


Já para o espectrograma das partículas NPM-SDS, no comprimento de onda de 1270  $\text{cm}^{-1}$  tem-se um pico característico da presença de uma ligação  $\text{-S=O}$ . Os picos nos comprimentos de onda entre 1050 e 964  $\text{cm}^{-1}$  são característicos do estiramento assimétrico das ligações entre  $\text{S-O-C}$ . Os sinais fracos em 2981 e 2854  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídos ao estiramento das ligações  $\text{C-H}$  das carbonilas do SDS (ANTONY; SHERINE; RAJENDRAN, 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998).

Nas curvas das duas amostras, a banda larga em 3364  $\text{cm}^{-1}$  refere-se à presença de hidroxilas que podem ser atribuídas a umidade adsorvida nas amostras.

As propriedades magnéticas para as nanopartículas NPM-SDS foram estudadas através de curvas de magnetização obtidas das análises de MAV. A partir dos dados obtidos da Figura 17, foram determinados os valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ), coercividade ( $H_c$ ) e magnetização remanente ( $M_r$ ).

Figura 17- Curva de magnetização NPM-SDS, com campo magnético de 20 kOe.



Os valores encontrados para  $H_c$  e  $M_r$  foram de 0,25 KOe e 0,022 emu/g, respectivamente. Estes baixos valores indicam um comportamento superparamagnético do material e a curva de magnetização sem histerese aparente pode ser relacionada à ausência de forças do tipo dipolo-dipolo fortes entre as nanopartículas de magnetita, típicas de nanopartículas superparamagnéticas (MAMANI; GAMARRA; DE SOUZA BRITO, 2014).

Segundo a literatura, nanopartículas de magnetita com tamanhos inferiores a 6 nm apresentam um comportamento superparamagnético (TEJA; KOH, 2009). Logo, este resultado concorda com o tamanho médio de partículas obtido.

A magnetita costuma apresentar valores de  $M_s$  na faixa de 60-90 emu/g, variando conforme o seu tamanho e área superficial (CHIOLERIO *et al.*, 2014). Para a amostra analisada o valor de  $M_s$  foi 55,0 emu/g. Este valor ligeiramente abaixo do valor característico também é reportado em outros trabalhos para NPM sintetizadas através do método de coprecipitação e pode ser associado a efeitos superficiais causados pela modificação química realizada com SDS, segundo reportado por Lee *et al.* (2009) e Tie *et al.* (2006).

As características texturiais como área superficial, diâmetro e volume médio dos poros da NPM-SDS foram investigadas através da determinação das isotermas de adsorção e dessorção de  $N_2$ , e calculadas

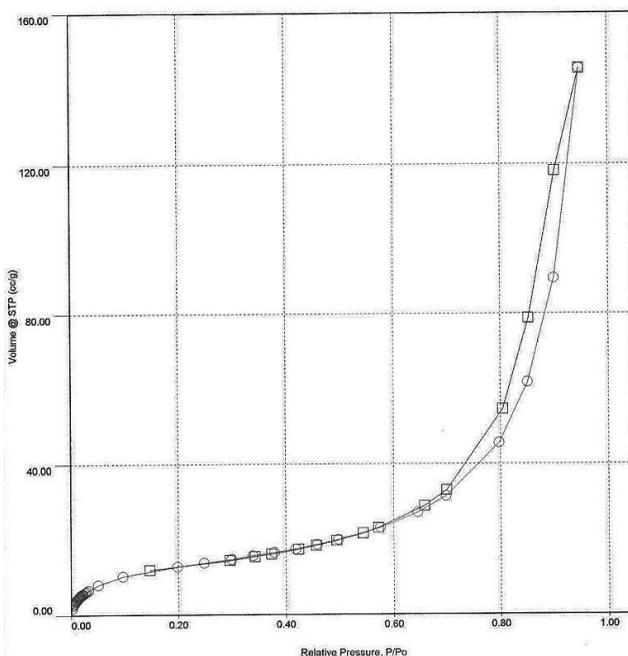
seguindo os modelos BET e BJH, respectivamente (ANEXOS 2 e 3). Os valores obtidos para cada propriedade são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4- Características porosas da NPM-SDS através dos métodos BET e BJH.

Área superficial (BET)	Volume dos poros (BJH)	Diâmetro médio dos poros
36,6 m <sup>2</sup> /g	0,23 cm <sup>3</sup> /g	62,6 Å

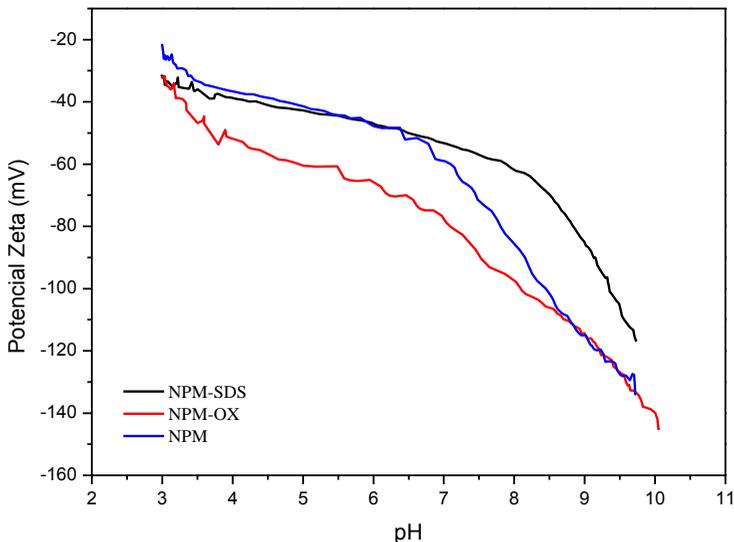
Segundo os valores de diâmetro dos poros obtidos, a NPM-SDS pode ser classificada como um material mesoporoso, conforme classificação da IUPAC. O perfil das suas isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub> apresentadas na Figura 18, também é similar ao apresentado por materiais com mesoporos (TEIXEIRA; COUTINHO; GOMES, 2001), o que indica uma adsorção monocamada-multicamada. Este tipo de adsorção é definida pela presença de uma histerese relacionada à condensação capilar do adsorvato em mesoporos ( REIS, 2013).

Figura 18- Isotermas de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub> para as partículas NPM-SDS



A mobilidade eletroforética da NPM-SDS foi calculada através das medidas de potencial zeta para as amostras NPM, NPM-OX e NPM-SDS e os resultados são apresentados na (Figura 19). Pode-se observar que as três amostras de magnetitas sintetizadas através da metodologia proposta apresentaram um comportamento similar, possuindo uma superfície fortemente negativamente e sem ponto isoelétrico. As maiores variações em relação às amostras se deu entre os valores de pH de 4-7 para as amostras NPM e NPM-OX, e entre 6,5 e 10 para as amostras NPM, NPM-OX e NPM-SDS.

Figura 19- Curva de titulação do potencial zeta das nanopartículas de magnetita, sem modificações (NPM), funcionalizada com oxalato de amônio (NPM-OX) e funcionalizada com lauril sulfato de sódio (NPM-SDS).



Os resultados obtidos, no entanto, foram bastante discrepantes dos encontrados na literatura para nanopartículas de magnetita pura, onde o ponto isoelétrico (pI) se encontra em valores de pH entre 4,2 e 6,8 (ERDEMOGLU; SARIKAYA, 2006). Em relação às amostras, a adição do oxalato aumentou o número de cargas negativas, resultantes da forte interação eletrostática causada pela interação entre a NPM e o oxalato, que formaram um quelato bidentado (ERDEMOGLU; SARIKAYA, 2006). A modificação da NPM-OX com NPM-SDS alterou levemente as cargas para valores menos negativos entre os pH 7 e 9, porém, esta mudança de potencial pode ser considerada

praticamente insignificante em relação as características globais da partícula.

A estabilidade de uma dispersão coloidal está diretamente relacionada com a magnitude do potencial zeta, que indica o grau de repulsão entre partículas adjacentes e similares na dispersão. Quando o valor do potencial zeta das partículas em suspensão é alto (valores acima de +30 mV e abaixo -30 mV) estas tendem a se repelir, conferindo estabilidade e evitando que a solução ou dispersão sofra agregação. Porém, quando o valor do potencial zeta é baixo (compreendido entre +30 mV e -30 mV), as forças de atração superam as de repulsão e a dispersão tende a coagular ou flocular (FERREIRA, 2012). Neste âmbito, as NPM sintetizadas apresentaram uma excelente estabilidade em suspensão, resultando em uma boa mobilidade eletroforética das partículas no meio reacional e apresentando uma baixa tendência a aglomeração, quando comparada com outros tipos de nanopartículas magnéticas.

#### 3.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos através da caracterização das partículas de magnetita NPM-SDS, foi possível obter importantes informações a respeito do material sintetizado.

O tamanho médio de partícula obtido na síntese da NPM-SDS foi de  $5,5 \pm 0,3$  nm, com área superficial de  $36,6 \text{ m}^2/\text{g}$ . O composto apresentou poros com diâmetro de  $62,6 \text{ \AA}$  e volume de  $0,23 \text{ cm}^3/\text{g}$  com características de materiais mesoporosos e superfície carregada negativamente.

Através dos difratogramas de raios-X, confirmou-se que a estrutura cristalina das nanopartículas sintetizadas é compatível com a magnetita. Comparando os difratogramas das amostras NPM, NPM-OX e NPM-SDS observou-se uma boa estabilidade das mesmas frente a processos oxidativos, não sendo observadas mudanças de fase na estrutura das partículas durante a etapa funcionalização com SDS.

A NPM-SDS apresentou magnetização de saturação em torno de  $55 \text{ emu/g}$  e um comportamento superparamagnético, permitindo sua manipulação através da aplicação de um campo magnético.

O comportamento superparamagnético auxiliou na estabilidade das nanopartículas eliminando as forças dipolo-dipolo superficiais, resultando em uma alta estabilidade em suspensão e uma fraca tendência à aglomeração.

Em relação à etapa de funcionalização da NPM-OX, foi observado que substituição do oxalato por SDS não ocorreu de forma completa durante a segunda etapa da síntese. Porém, devido às demais características como um reduzido tamanho de partículas, alta área superficial em relação ao pequeno tamanho de partículas, propriedades superparamagnéticas e elevada estabilidade em suspensão a NPM-SDS pode ser aplicado como suporte para imobilização enzimática.



## 4 IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Thermomyces lanuginosus* (TLL) NO SUPORTE NPM-SDS

### 4.1 INTRODUÇÃO

Neste capítulo serão descritos os resultados referentes à etapa de imobilização da lipase de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) no suporte magnético NPM-SDS e a caracterização bioquímica do derivado enzimático obtido (NPM-TLL).

Para avaliar a eficiência da imobilização, foram estudados parâmetros como estabilidade térmica, estabilidade frente a diferentes valores de pH, determinação do pH ótimo e irreversibilidade da imobilização (dessorção da enzima a partir do suporte magnético).

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Imobilizar a lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) no suporte sintetizado NPM-SDS através de mecanismos de adsorção;
- Caracterizar o derivado enzimático NPM-TLL em relação à estabilidade em diferentes temperaturas e pHs;
- Avaliar a força de interação entre a enzima e o suporte através de dessorção com soluções surfactantes e iônicas.

### 4.3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 4.3.1 Materiais

A lipase comercial de *Thermomyces lanuginosus* (TLL) (Novozymes) foi selecionada para a imobilização no suporte sintetizado NPM-SDS e no suporte comercial de sepharose 4CL ativada com brometo de cianogênio (CNBr) (GE Healthcare). Para a determinação da atividade hidrolítica das enzimas foi utilizado o substrato sintético butirato de *p*-nitrofenila (*p*-NPB) (Sigma-Aldrich). A determinação do teor de proteínas foi realizada com o reagente de Bradford (Sigma-Aldrich). Para a dessorção das enzimas foi utilizado brometo de cetil trimetil amônio (CTAB) e monolaurato de sacarose (MS).

### 4.3.2 Métodos

#### 4.3.2.1 Imobilização da lipase de TLL no suporte NPM-SDS:

Para a imobilização da lipase TLL, 1 g do suporte NPM-SDS foi pesado e adicionado a 20 mL de uma solução de cloreto de sódio aquoso a 0,1% (m/v) e aproximadamente 1 mL do preparado enzimático comercial de TLL. A mistura foi agitada mecanicamente a 300 rpm durante 30 min a temperaturas de 25 °C. Após este tempo, as partículas foram decantadas com auxílio de uma barra magnética e lavadas com água destilada até o resíduo de lavagem até apresentar um mínimo de proteínas dissolvidas.

O acompanhamento da imobilização foi realizado observando o decréscimo na atividade enzimática no sobrenadante. Para isto, foram coletadas alíquotas de 100 µL em determinados períodos de tempo e realizada a análise de acordo com o método de determinação da atividade hidrolítica descrito no item 4.3.2.3. A imobilização foi considerada completa quando a atividade no sobrenadante permaneceu constante. Alíquotas da suspensão também foram coletadas ao final do processo para a determinação da atividade final no derivado enzimático.

#### 4.3.2.2 Imobilização da TLL no suporte CNBr

O suporte comercial de sepharose 4CL ativada com brometo de cianogênio (CNBr) foi utilizado para a imobilização da lipase TLL. Primeiramente, o suporte CNBr foi ativado durante 20 min sob agitação em água destilada acidificada até pH 2,0, sendo filtrado ao final. Após, 1 mL de extrato enzimático foi adicionado a 20 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) e a imobilização conduzida durante 10 min à 4 °C sob fraca agitação. Em seguida, o derivado enzimático foi encubado em solução de etanolamina 1 M (pH 8,0) durante 1,5 h, sendo por fim filtrado e lavado abundantemente com água destilada (MATEO et al., 2006c).

Segundo Mateo *et al.* (2006) essa estratégia evita a possibilidade de ligação covalente multipontual entre a enzima e o suporte, fazendo com que a mesma fique fracamente ligada ao suporte através de uma única ligação covalente e possuindo, assim, um comportamento semelhante ao da enzima solúvel. Este protocolo é utilizado para evitar problemas de agregação ou forças intermoleculares que possam modificar a estrutura nativa da enzima, dependendo das condições em

que for analisada, e pode ser utilizado como parâmetro para avaliar o comportamento da enzima na sua forma livre (MATEO *et al.*, 2007; PESSELA *et al.*, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2009a).

#### 4.3.2.3 Determinação da atividade hidrolítica do derivado NPM-TLL

A atividade hidrolítica da lipase foi medida por método colorimétrico através de um aumento da absorbância na faixa de 348 nm, produzido pela formação do composto *p*-NP na reação de hidrólise do *p*-NPB.

Para as análises, uma amostra de 10 ou 20  $\mu\text{L}$  de extrato enzimático foi adicionada a 2,5 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0), iniciando a reação pela adição de 20  $\mu\text{L}$  de *p*-NPB 50mM. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi modelo U-2900) com agitação magnética e temperatura ajustada a 25°C, durante um tempo de reação de 2 min. A atividade hidrolítica foi calculada conforme a Equação 5 com coeficiente de extinção molar ( $\epsilon$ ) para o *p*-NPB de 5,15  $1/(\mu\text{M cm})$ . Uma unidade (U) de atividade enzimática de hidrólise foi definida como a quantidade de enzima que catalisa a produção de 1  $\mu\text{mol}$  de *p*-NP por minuto sob as condições experimentais (MORENO-PÉREZ; GUI SAN; FERNANDEZ-LORENTE, 2014).

$$A_t = \frac{\sigma \cdot V_{final}}{\epsilon \cdot c \cdot V_{amostra}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde:

$A_t$  = atividade hidrolítica total do derivado enzimático [U/mL];

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

$V_{amostra}$  = volume de extrato enzimático ou amostra contendo o derivado enzimático [mL];

$\epsilon$  = coeficiente de extinção molar do substrato [ $1/(\mu\text{M cm})$ ];

$c$  = caminho ótico (1 cm);

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

A atividade específica do derivado enzimático foi calculada conforme a Equação 6, relacionando a atividade hidrolítica total expressa em U/mL, com a massa do suporte utilizada na imobilização.

$$A_f = \frac{A_t}{m_{amostra}} \cdot V_{amostra} \quad \text{Equação 6}$$

Onde:

$A_f$  = atividade hidrolítica específica do derivado enzimático [U/g];

$A_t$  = atividade hidrolítica total do derivado enzimático [U/mL];

$m_{amostra}$  = massa do suporte na amostra [g];

$V_{amostra}$  = volume da amostra contendo o derivado enzimático [mL];

O cálculo do rendimento experimental da imobilização foi realizado a partir da Equação 7, descrita abaixo.

$$RI = \left(1 - \frac{A_f}{A_i}\right) \cdot 100 \quad \text{Equação 7}$$

Onde:

$RI$  = rendimento da imobilização [%];

$A_i$  = Atividade enzimática total no sobrenadante, oferecida inicialmente [U/g];

$A_f$  = Atividade enzimática total no sobrenadante, ao final da imobilização [U/g].

A atividade final do derivado enzimático, definida como atividade recuperada foi calculada através da Equação 8:

$$A_r = \frac{A_f}{A_i} \cdot 100 \quad \text{Equação 8.}$$

Onde:

$A_r$  = Atividade recuperada [%];

$A_i$  = Atividade enzimática específica no sobrenadante, oferecida inicialmente [U/g];

$A_f$  = Atividade enzimática específica no derivado enzimático ao final da imobilização [U/g].

#### 4.3.2.4 Determinação do teor de proteínas no preparado enzimático comercial de TLL.

A determinação do teor de proteínas nos preparados enzimáticos comerciais foi realizada pelo método de Bradford (1976) o qual consiste no aumento da absorbância na região de 595 nm causada pela concentração de proteínas na solução de corante Azul Brillhante de Coomassie G-25 (reagente de Bradford).

#### 4.3.2.5. Ensaio de termoestabilidade do derivado enzimático

Para avaliar a estabilidade térmica do derivado NPM-TLL, cerca de 100 mg do derivado enzimático foi adicionado a 1,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) e colocado sob agitação em diferentes temperaturas. A atividade do derivado foi medida conforme metodologia descrita no item 4.2.3.1 a cada período de tempo até sua desativação (RODRIGUES et al., 2009b).

#### 4.3.2.6 Ensaio de estabilidade da lipase imobilizada frente a diferentes pHs

A estabilidade do derivado NPM-TLL frente a diferentes valores de pH foi realizada adicionando 100 mg de derivado enzimático em soluções tampões com diferentes valores de pH e deixados em temperatura ambiente por 24 h. Amostras da suspensão contendo o derivado enzimático foram coletadas a cada período de tempo acompanhando sua atividade hidrolítica através da metodologia descrita no item 4.2.3.1

#### 4.3.2.7 Determinação do pH ótimo do derivado NPM-TLL

O pH ótimo do derivado enzimático foi medido através da suspensão de 100 mg do derivado em 1,0 mL de solução tampão fosfato de sódio 25 mM, pH 7,0. A medida da atividade hidrolítica foi medida conforme o item 4.3.2.1, porém, utilizando soluções tampões 25 mM de citrato de sódio (pH 3,0-6,0), fosfato de sódio (pH 7,0-8,0) e bicarbonato de sódio (pH 9,0-10) para verificar a influência dos diferentes pHs na atividade hidrolítica dos derivados enzimáticos (CIPOLATTI et al., 2015).

#### 4.3.2.8 Ensaio de dessorção da lipase do derivado NPM-TLL

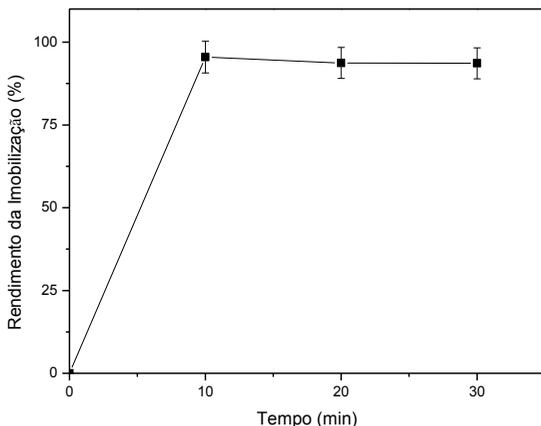
A força e o mecanismo de adsorção da lipase sobre o suporte NPM-SDS foram avaliados a partir de sua dessorção com os surfactantes CTAB e MS, e soluções iônicas de NaCl, em diferentes concentrações. A atividade hidrolítica da suspensão e do sobrenadante foi medida em intervalos de tempo de 30 min (FERNANDEZ-LORENTE et al., 2008b).

### 4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.4.1 Imobilização da Lipase TLL no Suporte NPM-SDS

A imobilização da TLL no suporte NPM-SDS (suporte previamente seco através de liofilização) ocorreu em apenas 10 min atingindo um rendimento experimental de até 95 %, conforme a Figura 20, com os valores médios replicados com erro de 5 %.

Figura 20- Rendimento da imobilização da lipase TLL no suporte NPM-SDS, utilizando concentração de proteínas de  $1,83 \text{ mg}_{\text{proteína}} \cdot \text{mL}^{-1}$ , para g de suporte, em temperatura ambiente.



O derivado enzimático mostrou uma hiperativação no fator de três vezes em relação sua atividade inicial, onde a atividade específica da solução enzimática fornecida foi de  $240,0 \pm 12,0 \text{ U/g}$  e a atividade específica obtida no derivado enzimático  $720,0 \pm 36,0 \text{ U/g}$

(concentração de proteínas de 1,85 mg/mL). Após secagem do derivado através de liofilização, foi observada uma atividade específica ainda maior, no valor de  $1240 \pm 62,0$  U/g com um fator de ativação de cinco vezes.

O aumento de atividade enzimática após a etapa de secagem pode ser atribuída a uma menor aglomeração das partículas quando liofilizado, deixando a lipase adsorvida ao suporte mais disponível ao meio reacional do que no derivado ainda em solução aquosa. Um comportamento similar foi observado ao comparar os efeitos do suporte NPM-SDS úmido e seco através de liofilização. A atividade recuperada observada no derivado imobilizado em partículas liofilizadas foi cerca de dez vezes mais do que quando utilizado partículas ainda úmidas. O aumento da área superficial obtido pela secagem em liofilizador permite uma maior carga de proteínas adsorvidas. Além disso, como a imobilização ocorre rapidamente, ao passo que a enzima vai sendo adsorvida ao suporte, a superfície da NPM-SDS vai sendo ocupada pela proteína evitando com que as partículas tornem a um estado de aglomeração igual ao inicial. Esses dados demonstram que o tratamento dado ao derivado ao final da imobilização é uma etapa que não pode ser ignorada, uma vez que pode melhorar consideravelmente as características do derivado enzimático em relação a sua atividade catalítica.

A capacidade máxima de proteína adsorvida na NPM-SDS foi avaliada conforme os dados da Tabela 5, que apresenta os resultados de adsorção de proteínas com concentrações variando entre 0,25-3,3 mg/mL. Os valores de proteína foram determinados através da metodologia de Bradford.

Tabela 5- Carga máxima de proteína adsorvida no suporte NPM-SDS, mediante diferentes concentrações de TLL. Condições experimentais: temperatura ambiente, 1h, pH 7,0.

<b>NPM-SDS (g)</b>	<b>V<sub>TLL</sub> (mL)</b>	<b>V<sub>NaCl</sub> 0,1% (mL)</b>	<b>P (mg/mL)</b>	<b>P<sub>T</sub> (mg)</b>	<b>P<sub>I</sub> (mg)</b>	<b>P<sub>I</sub> (%)</b>	<b>CM (mg/g<sub>NPM-SDS</sub>)</b>
1,0	1,0	20	0,25	14,9	11,0	73,8	36,7
1,0	1,0	10	0,5	14,9	10,0	67,0	33,3
0,3	0,9	6	2,2	12,9	11,1	86,0	37,0
0,3	1,5	6	3,3	20,0	10,4	51,9	34,7

\* P = concentração de proteínas em solução; P<sub>T</sub> = massa total de proteína; P<sub>I</sub> = massa de proteína imobilizada; CM = capacidade máxima de proteína adsorvida no suporte.

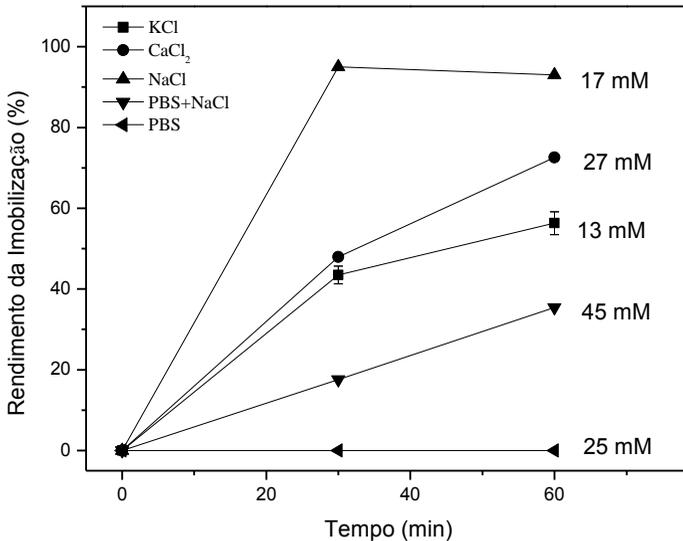
Conforme os dados expressos acima, foi possível imobilizar uma quantidade média de  $35,7 \pm 1,7$  mg proteína/g NPM-SDS. Observando os fatores de diluição das amostras com concentrações de 0,5, 0,3 e 3,3 mg/mL, percebe-se que a quantidade de proteína imobilizada foi aproximadamente a mesma, não indicando a formação de agregados enzimáticos. A quantidade de proteína adsorvida está de acordo com o esperado, dada à elevada área superficial específica do suporte em relação ao seu volume que, conseqüentemente, suporta uma elevada concentração de proteínas (CAO *et al.*, 2012; CARVALHO; LIMA; SOARES, 2015; LAURENT *et al.*, 2008).

Embora em processos de imobilização enzimática seja esperada uma menor atividade no derivado, a hiperativação da enzima após a imobilização pode ser explicado pelo mecanismo de ativação interfacial das lipases, característico de um mecanismo de imobilização hidrofóbico conforme discutido no item 2.1 1.

No entanto, dado a grande densidade de cargas negativas da superfície do suporte, a imobilização pode, também, ocorrer através de adsorção iônica. Além disto, sabe-se que a imobilização através de um mecanismo hidrofóbico ocorre mediante a presença de baixa força iônica, sendo que neste caso o que foi analisado foi um comportamento contrário. Foram testadas soluções de NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> nas concentrações 0,1% (m/v), além de solução tampão de fosfato de sódio (PBS, 25 mM) e solução tampão fosfato de sódio (25mM com 0,1% de NaCl). A força iônica das soluções testadas foram de 17, 13, 9, 25, e 42 mM para NaCl, KCL, CaCl<sub>2</sub>, PBS e PBS+NaCl respectivamente.

Observou-se que, na presença de sais, a imobilização da TLL ocorreu com altos rendimentos, obtendo 98 % de imobilização para o NaCl, 75 % para CaCl<sub>2</sub> e 56 % com KCl, em 60 min de incubação. O mesmo comportamento foi observado por Lee *et al.*, (2008) na imobilização da lipase de porcina pancreática, e Bork *et al.* (2015) com a lipase de *Rhizomocus miehei* no mesmo tipo de suporte, utilizando uma solução de NaCl 0,85 % (força iônica de 145,5 mM). A Figura 21 mostra o comportamento em relação ao rendimento de imobilização da TLL no suporte NPM-SDS, nas soluções estudadas.

Figura 21- Rendimento de imobilização da TLL em NPM-SDS mediante diferentes valores de força iônica, utilizando NaCl, KCl, CaCl<sub>2</sub> 0,1% (m/v); tampão fosfato de sódio (PBS) 25mM e tampão fosfato de sódio com NaCl (PBS+NaCl, 25mM + 0,1%), durante 60 min de incubação e temperatura ambiente. Os valores ao lado de cada curva indicam a força iônica para cada solução.



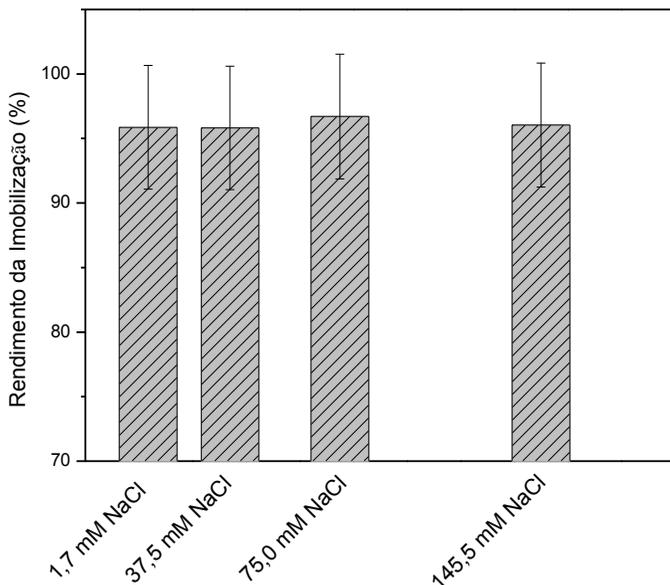
Nas curvas referentes ao rendimento de imobilização com diferentes soluções iônicas, percebe-se que o fator que influencia o rendimento de imobilização não é o valor da força iônica. Para confirmar, foi escolhida a solução de NaCl para realizar uma análise da influência da concentração do sal. A Figura 22 apresenta o rendimento de imobilização da TLL no suporte NPM-SDS em concentrações de NaCl variando entre 1,7 e 145,5 mM ( para o NaCl a concentração e força iônica possuem valores correspondentes). Valores superiores a 145,5 mM de NaCl não foram testados pois uma elevada força iônica pode causar a dessorção da enzima.

Os resultados indicam que a concentração de NaCl não influencia de forma significativa a imobilização da TLL, sugerindo que a condição necessária para que ocorra a imobilização está mais relacionada à presença de íons em solução, do que em relação a força iônica aplicada.

Este mecanismo de imobilização pode ser considerado bastante complexo, uma vez que é possível perceber características tanto de

adsorção iônica quanto hidrofóbica, levando a crer que a imobilização da TLL ocorra através de um mecanismo híbrido.

Figura 22- Rendimento de imobilização da TLL em NPM-SDS com diferentes concentrações de NaCl durante 30 min de incubação.



Apesar deste comportamento não ser característico de lipases, em alguns casos é possível, também, que ocorra a hiperativação da enzima mesmo em mecanismos de adsorção iônica, conforme descrito por Quilles Jr. (2014). Segundo o autor, este comportamento foi observado na imobilização da lipase de *Acremonium sp.* imobilizada em DEAE-agarose (suporte iônico), onde concentrações de até 90 mM de NaCl forneceram hiperativação da lipase. Embora a lipase de TLL seja bastante estudada e a influência de sais como cofatores não seja amplamente descrita, pode-se entender que a presença de NaCl funcione adicionalmente como um cofator que hiperativa a enzima.

#### 4.4.2 Avaliação da Força de Interação Entre Enzima-Suporte

Para avaliar a força de interação entre a TLL e o suporte NPM-SDS, assim como para auxiliar na compreensão do mecanismo envolvido na imobilização, foi realizada a dessorção da lipase a partir do

suporte magnético testando diferentes soluções de detergente e solução iônica.

A Tabela 6 apresenta a proporção de lipase desorvida utilizando cada uma das soluções testadas, bem como o tipo de mecanismo sugerido em cada teste.

Tabela 6 - Dessorção da TLL do suporte NPM-SDS utilizando soluções de detergente (CTAB e LC) e soluções iônicas (NaCl) em diferentes concentrações.

<b>Solução</b>	<b>% Dessorção</b>	<b>Mecanismo</b>
CTAB 0,5%	23,3	Adsorção hidrofóbica
CTAB 1,0%	32,3	Adsorção hidrofóbica
MS 1,0%	20,1	Adsorção hidrofóbica
0,5 M NaCl	21,5	Adsorção iônica
0,2 M NaCl + 0,5% CTAB	16,9	Adsorção hidrofóbica/iônica

Os resultados obtidos corroboram com os mecanismos de imobilização propostos, que sugerem que existe um mecanismo duplo entre adsorção hidrofóbica e iônica. Ao adicionar soluções de detergente (CTAB ou MS), foi possível remover parte da lipase adsorvida hidrofobicamente. Já ao adicionar uma solução iônica, a fração imobilizada de forma iônica foi removida.

No entanto o máximo de lipase desorvida foi 32 % utilizando solução de CTAB 1 % (v/v) e 21,5 % com solução de NaCl 0,5M. Acima destas concentrações, houve a desativação do biocatalisador. Segundo Horst, Lassalle e Ferreira (2015), o SDS é um adsorvente altamente potente, o que pode explicar a forte interação entre a lipase e o suporte sugerindo que a imobilização ocorreu de forma bastante intensa ao suporte magnético.

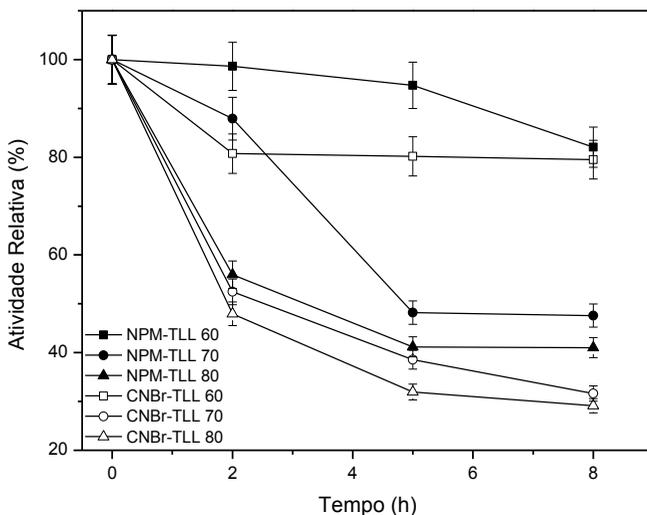
#### 4.4.3 Estabilidade Térmica do Derivado NPM-TLL

A estabilidade térmica do derivado NPM-TLL foi avaliada nas temperaturas de 60,70 e 80 °C durante 8 h. Na Figura 23 é possível observar o perfil de desativação térmica do derivado em relação ao tempo para as temperaturas selecionadas, comparado com o derivado CNBr-TLL utilizado como referência para a lipase na sua forma livre.

O derivado NPM-TLL apresentou uma maior estabilidade frente a altas temperaturas em relação ao derivado CNBr-TLL, chegando a um

incremento de aproximadamente 10 % em sua atividade recuperada nas temperaturas de 70 e 80 °C. A 60 °C, tanto o derivado NPM-TLL quanto a lipase livre sofrem pouca desativação após 8 h, mantendo 80 % de sua atividade. No entanto, em temperaturas de 70 e 80 °C, ocorreu uma perda de atividade de 40% para o derivado NPM-TLL e de mais de 50 % para o CNBr-TLL, em relação a suas atividades iniciais após 5h, mantendo-se estáveis nas 3 h seguintes. A TLL é uma enzima que apresenta uma alta estabilidade, logo, estes resultados e que possui uma faixa de temperatura de trabalho bastante alta, com temperaturas de trabalho de até 50-60 °C (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010). Considerando que a enzima TLL apresenta uma boa estabilidade na sua forma livre, aumentos de estabilidade mesmo que em uma pequena proporção representam um resultado significativo.

Figura 23- Comparação da estabilidade térmica dos derivados NPM-TLL e CNBr-TLL nas temperaturas de 60, 70 e 80°C, em pH 7,0 e tempo de 8 h.



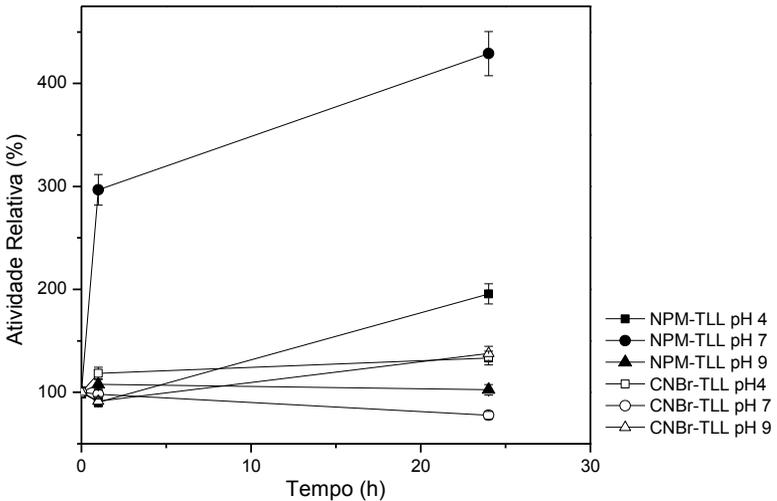
#### 4.4.3 Estabilidade Frente a Diferentes pHs e pH Ótimo

Os resultados da avaliação da estabilidade do derivado NPM-TLL em relação a diferentes pHs podem ser visualizados de acordo com a Figura 24, que mostra os valores de atividade relativa dos derivados ao

longo do tempo em cada pH estudado, estabelecendo como 100 % de atividade no tempo inicial.

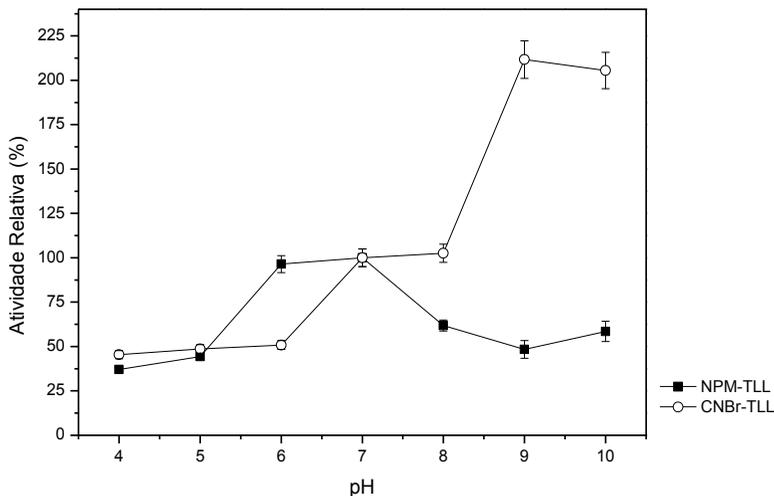
Os melhores resultados foram obtidos em pH 7,0, no qual houve uma hiperativação após 24 h de agitação, tendo sua atividade recuperada aumentada cerca de quatro vezes ao passo que o derivado CNBr-TLL perdeu reteve 80% de atividade nas mesmas condições. Em pH 9, houve uma pequena hiperativação do derivado CNBr-TLL, que pode ser explicada devido ao pH ótimo da TLL livre neste valor. Em pH 4 ambos os derivados obtiveram um comportamento semelhante, também levemente hiperativados. Em relação ao pH ótimo do derivado NPM-TLL, este apresentou um melhor desempenho em pH ótimo próximo a 10 e não demonstrando uma grande variação de atividade nos outros pHs estudados, quando comparado com o derivado CNBr-TLL.

Figura 24- Estabilidade do derivado NPM-TLL em soluções tampão com pH 4,7 e 9, e temperatura ambiente e tempo de análise de 24 h.



A partir das atividades residuais dos derivados, percebe-se que a imobilização nas partículas em NPM resulta em uma mudança no comportamento da lipase quando comparada com a lipase livre, principalmente em pH neutro, aumentando a estabilidade e atividade do derivado imobilizado. Os dados obtidos são apresentados na Figura 25

Figura 25- Atividade relativa do derivado NPM-TLL em diferentes valores de pH, onde o pH 7,0 é definido como 100% de atividade relativa.



#### 4.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O suporte NPM-SDS mostrou-se apto para a imobilização da lipase TLL, apresentando capacidade de carga de  $35,7 \pm 1,7$   $\text{mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{NPM-SDS}}$  em até 30 min, com uma hiperativação de cinco vezes em relação à atividade inicial fornecida para imobilização. O mecanismo de imobilização apresentou um comportamento misto de adsorção iônica e adsorção hidrofóbica, resultante da funcionalização incompleta do suporte com SDS e do caráter fortemente negativo do suporte NPM-SDS.

A hiperativação da enzima frente a condições de imobilização iônica e hidrofóbica, mesmo em baixas concentrações de NaCl, sugere que este sal funcione como um cofator no processo de imobilização. No entanto, este resultado merece ser investigado mais a fundo futuramente.

O derivado NPM-TLL apresentou uma boa estabilidade térmica, com um aumento de atividade hidrolítica de cerca de 10% em relação ao suporte CNBr-TLL utilizado como referencial da enzima livre. O biocatalisador não teve perdas significativas de atividade em temperaturas de 60°C. Porém, em temperaturas de 70 e 80°C, houve perdas em torno de 50% de sua atividade recuperada inicial após 5 h de incubação em temperatura ambiente.

A estabilidade frente a diferentes valores de pH mostrou que o derivado enzimático se comporta de forma estável em todas as condições testadas, apresentando um pH ótimo em 10. Este resultado é bastante promissor, permitindo realizar modificações químicas superficiais no derivado em reações que ocorrem em pH diferentes do neutro.

As interações entre a lipase e o suporte apresentaram um caráter forte, não sendo possível desorver totalmente a lipase a partir do suporte através dos métodos testados. Mesmo não sendo possível a recuperação do suporte para reuso, a minimização de problemas relacionados à perda de carga de proteína, característicos deste mecanismo de imobilização, é um efeito positivo ao levar em conta futuras aplicações deste derivado em condições reacionais intensas.



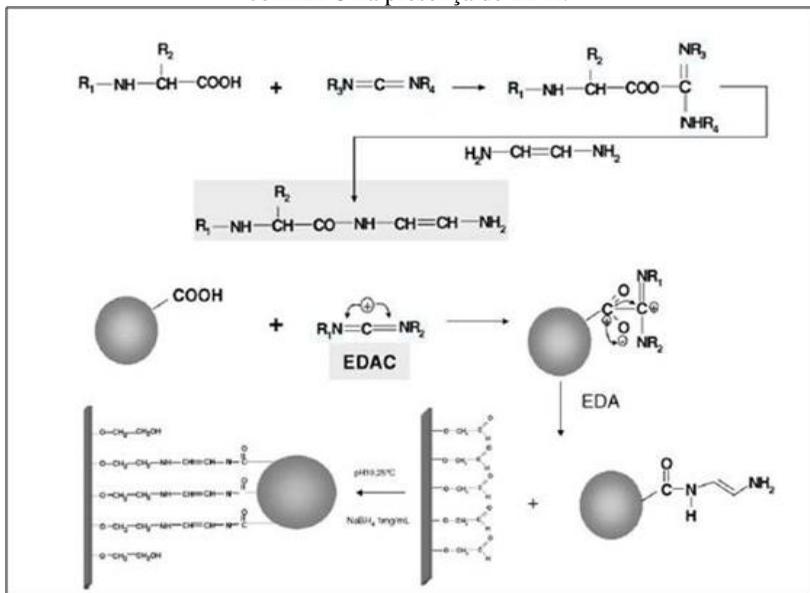
## 5 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO DERIVADO ENZIMÁTICO NPM-TLL E COIMOBILIZAÇÃO DA $\beta$ -D-GALACTOSIDASE

### 5.1 INTRODUÇÃO

Conforme discutido anteriormente, a utilização de nanopartículas de magnetita como suporte para a imobilização de enzimas demanda uma série de modificações estruturais a fim de torná-lo apto a interagir superficialmente com determinados tipos de proteínas. No caso da aplicação deste tipo de material para a coimobilização de duas ou mais enzimas em um único suporte, devem ser levadas em conta, também, as dificuldades e limitações do processo de coimobilização de enzimas na obtenção de um biocatalisador multifuncional estável.

Uma estratégia que pode ser adotada é a modificação superficial da primeira enzima imobilizada, permitindo assim a coimobilização de uma segunda proteína. Esta metodologia baseia-se na modificação química dos grupos carboxílicos superficiais de uma proteína (carboxílico terminal, Asp e Glu) através da reação com 1,2-etilenodiamina (EDA) e 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), pelo método de acoplamento. Nesta reação, primeiramente estudada por Hoare, Olson e Koshland (1968), ocorre a formação de uma amida entre os grupos carboxílicos ativados pelo EDC de uma das proteínas e um dos grupos amino do EDA, gerando um grupo amino primário livre (LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). Esta metodologia é frequentemente utilizada com o objetivo de enriquecer a superfície de proteínas em grupos amino, facilitando a imobilização através de ligação covalente multipontual, conforme demonstrado na Figura 26.

Figura 26- Aminoação química dos grupos carboxílicos de uma proteína ativados com EDC na presença de EDA.



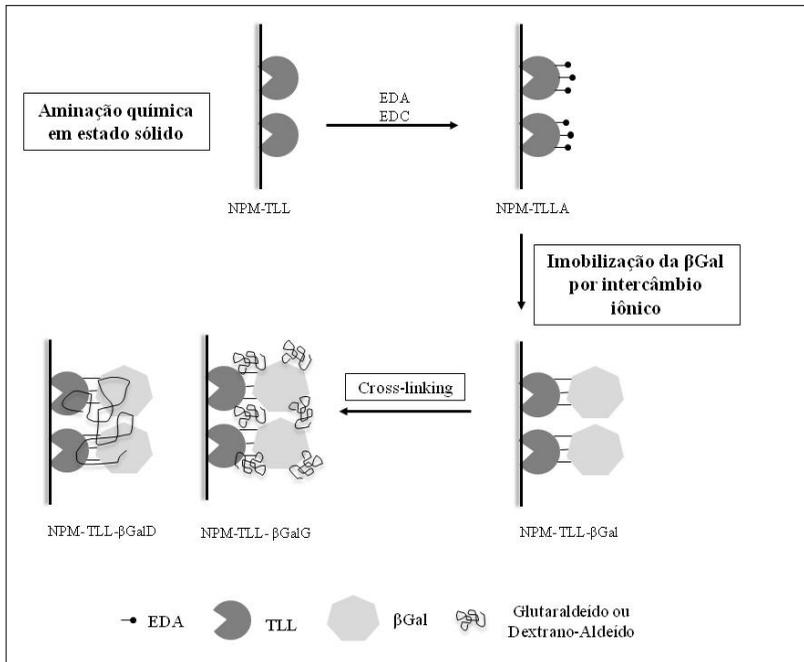
Fonte: López-Gallego *et al.*, (2005)

Assim, esta estratégia foi adaptada para promover a modificação química do derivado enzimático NPM-TLL através da aminoação da lipase adsorvida, permitindo a coimobilização da  $\beta$ Gal através de um mecanismo de troca iônica. Por fim, para aumentar a estabilidade do derivado coimobilizado foi realizado o entrecruzamento de ligações através da reticulação das proteínas envolvidas com glutaraldeído e dextrano-aldeído. A Figura 27 apresenta o esquema do protocolo adotado.

O glutaraldeído é reagente bifuncional que pode reagir com diferentes proteínas, envolvendo, principalmente, os grupos amino primários, embora possa também reagir com outros grupos (tióis, fenóis e imidazóis) (BARBOSA *et al.*, 2012). Devido sua grande versatilidade, é um dos agentes mais utilizados para a ativação de suportes enzimáticos, sendo frequentemente usado em processos de imobilização de enzimas. A aplicação do glutaraldeído nestes processos ocorre basicamente com dois objetivos: 1) ativar o suporte aminado com glutaraldeído e imobilizar a enzima através de intercâmbio iônico, ou 2)

adsorver as proteínas nos suportes aminados e tratar o derivado enzimático com glutaraldeído para reticular a enzima e o suporte (BARBOSA et al., 2012; BETANCOR et al., 2006a).

Figura 27- Esquema da estratégia de modificação dos grupos carboxílicos da TLL através da aminação química em fase sólida do derivado NPM-TLL, com etilenodiamina (EDA), 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), e posterior coimobilização da  $\beta$ -D-Galactosidase



Fonte: desenvolvido pela autora.

Ambas as metodologias ocorrem através de um mecanismo de imobilização similar: a adsorção da proteína ao suporte através de adsorção iônica, seguido da formação de ligações covalentes. Na primeira metodologia, ocorre uma pré-ativação do suporte aminado através da reação entre o glutaraldeído e os grupos amino primários do suporte. A melhor condição corre quando duas moléculas de glutaraldeído reagem com os grupos amino gerando uma estrutura bastante reativa com os grupos amino da enzima (BARBOSA et al., 2012; LOPEZ-GALLEGO et al., 2005).

Já na segunda metodologia, todos os grupos amino presentes na superfície da proteína previamente adsorvida ao suporte de forma iônica reagem com apenas uma molécula de glutaraldeído promovendo ligações covalentes multipontuais bastante intensas, gerando uma alta estabilização do derivado impedindo a dissociação das proteínas imobilizadas (BARBOSA et al., 2012; LOPEZ-GALLEGO et al., 2005). Esta segunda estratégia é frequentemente relatada na literatura (BARBOSA et al., 2014; LOPEZ-GALLEGO et al., 2005; NICOLETTI et al., 2015; PESSELA et al., 2007), e foi selecionada para estudo neste capítulo.

Assim como o glutaraldeído, outros reagentes macromoleculares polifuncionais podem ser utilizados para realizar o entrecruzamento da enzima, como o dextrano-aldeído (obtido a partir da oxidação do dextrano com  $\text{NaIO}_4$ ). Este biopolímero é capaz de promover uma alta estabilização do derivado enzimático, prevenindo a dissociação de enzimas multiméricas. A grande diferença entre o glutaraldeído e o dextrano-aldeído é que enquanto o primeiro pode reagir com a proteína inter e intramolecularmente, o segundo atua recobrando toda a superfície da proteína causando poucos efeitos relacionados a modificações estruturais (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; FUENTES et al., 2004).

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Modificar o derivado enzimático NPM-TLL através da aminação química da lipase;
- Coimobilizar a  $\beta$ -D-Galactosidase no derivado modificado através de um mecanismo de intercâmbio iônico;
- Estabilizar o derivado enzimático coimobilizado através de entrecruzamento;
- Caracterizar os derivados produzidos em relação a sua estabilidade térmica e em diferentes valores de pH;
- Avaliar a força de união das enzimas em relação ao suporte magnético.

## 5.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.3.1 Materiais

A enzima selecionada para este estudo foi a  $\beta$ -D-Galactosidase de *Klucерomyces lactis* (Proquiga). Para a modificação química do derivado enzimático foram utilizados etanolamina, etilenodiamina (EDA), 1-etil-3-(3-cloridrato) dimetilaminopropil carbodiimida (EDC), dextrana (40.000 Da) (todos da Sigma-Aldrich), glutaraldeído (VWR Chemicals) e membranas para diálise tamanho 2 (Medicell Membranes). Como substrato para determinação da atividade hidrolítica dos derivados foi utilizado *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo (*o*-NPG) (Sigma Aldrich). Para a dessorção da  $\beta$ -D-Galactosidase foi utilizado NaCl (Sigma Aldrich).

### 5.3.2 Métodos

#### 5.3.2.1 Aminoação Química do Derivado NPM-TLL

O derivado NPM-TLL foi aminado conforme protocolo descrito por (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008), onde 1 g da NPM-TLL foi adicionado a 10 mL de uma solução de EDA (pH 4,75) e 10 mM de EDC. A mistura foi agitada durante 1,5 h e decorrido este tempo o derivado aminado foi separado através do auxílio de uma barra magnética, sendo lavado primeiramente com tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,5) e depois com água destilada. O derivado aminado foi chamado de NPM-TLLA. A confirmação da etapa de aminoação foi realizada através de análises de FTIR-ATR conforme descrito no item 3.2.2.4.

#### 5.3.2.2 Coimobilização da $\beta$ -D-galactosidase no Derivado Aminado NPM-TLLA

A  $\beta$ -D-galactosidase ( $\beta$ Gal) foi solubilizada em 20 mL de tampão fosfato de sódio 25 mM (pH 7,0) e adicionada a 1 g do derivado aminado NPM-TLLA. A mistura foi mantida sob agitação durante 2 h. Após este tempo, as partículas foram separadas com um magneto e lavadas primeiramente com tampão fosfato e, após, com água destilada. O tempo mínimo de reação necessário para a imobilização da enzima no derivado aminado foi determinado a partir do acompanhamento do decréscimo da atividade observada no sobrenadante. Para isto, foram

coletadas alíquotas de 100  $\mu$ L em determinados períodos de tempo e realizado a análise de proteínas de acordo com o método de determinação da atividade hidrolítica descrito no item 4.3.2.3. Após a imobilização, o derivado enzimático foi liofilizado durante 24 h para completa evaporação da água. O novo derivado enzimático foi chamado NPM-TLL- $\beta$ Gal.

#### 5.3.2.3 Entrecruzamento do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal com glutaraldeído

Uma alíquota de 1 g do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal foi adicionado a 20 mL de soluções de glutaraldeído com concentrações de 0,5 e 1,0 %, preparadas em tampão fosfato de sódio 25 mM e pH 7,0. A suspensão foi agitada durante 5 h a 4 °C em ambiente protegido da luz. Após o tempo de reação, os derivados enzimáticos intercruzados (NPM-TLL- $\beta$ GalG05 e NPM-TLL- $\beta$ GalG1) para as concentrações de 0,5% e 1,0% de glutaraldeído, respectivamente) foram separados do meio reacional com o auxílio de uma barra magnética, lavados abundantemente com água destilada e novamente liofilizados durante 24 h. Segundo a metodologia proposta, este procedimento permite modificar completamente os aminoácidos primários da enzima e do suporte, ativando-os com uma única molécula de glutaraldeído e estabelecendo uma ligação covalente multipontual (LOPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005).

#### 5.3.2.4 Entrecruzamento do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal com dextrana-aldeído

Primeiramente realizou-se a preparação da dextrana-aldeído através da oxidação dos grupos hidroxilas da dextrana em grupos aldeídos, pela reação com periodato de sódio ( $\text{NaIO}_4$ ). Para a reação foi preparada uma solução com concentração de 33,33 mg/mL de dextrana (40 kDa) em água destilada, adicionando 2 mmols de  $\text{NaIO}_4$ , mantendo a mistura sob leve agitação e em banho de gelo durante 2 h. Para remover o formaldeído formado como subproduto, a solução de dextrana-aldeído foi dialisada durante 15 h a 4 °C, realizando a troca da água a cada 3 h (FUENTES *et al.*, 2004).

Para a reação de entrecruzamento de ligações do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal, preparou-se 10 mL de uma solução contendo 30 % (v/v) de dextrana-aldeído em tampão fosfato de sódio 25 mM e pH 7,0 e adicionou-se 1 g do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal. O frasco contendo a

suspensão foi agitado durante 5 h a 4 °C em ambiente protegido da luz. Após a reação, o novo derivado enzimático intercruzado, chamado NPM-TLL-βGalD, foi recuperado do meio reacional com o auxílio de uma barra magnética, lavado abundantemente com água destilada e novamente liofilizado durante 24 h (RODRIGUES *et al.*, 2009b).

#### 5.3.2.5 Imobilização da β-D-galactosidase em suporte comercial CNBr

Para comparar a estabilidade da enzima em sua forma livre, foi adotada a metodologia descrita no item 4.3.2.2, realizando a imobilização em suporte comercial sepharose 4CL ativado com brometo de cianogênio.

#### 5.3.2.6 Determinação da atividade hidrolítica dos derivados enzimáticos

A atividade hidrolítica da β-D-galactosidase foi determinada através de um aumento da absorbância na faixa de 405 nm, produzido pela formação do *o*-nitrofenolato (*o*-NP) na reação de hidrólise do *o*-NPG. Para a reação, 10 μL de extrato enzimático foi adicionado a 2,0 mL de solução de *o*-NPG 4 mg/mL preparada em solução tampão fosfato de sódio 50 mM e pH 7,0. A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi modelo U-2900) com agitação magnética e temperatura ajustada a 25°C. Atividade hidrolítica e o rendimento experimental da imobilização foram calculados conforme as Equações 5 e 6, respectivamente, com fator de correlação para o *o*-NPG de 3,1 1/(μM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) (BOLIVAR *et al.*, 2010).

#### 5.3.2.7 Determinação do Teor de Proteínas no Preparado Enzimático de β-D-galactosidase

O teor de proteínas foi determinado conforme metodologia descrita no item 4.3.2.4

#### 5.3.2.8. Ensaio de Termoestabilidade do Derivado Enzimático

A estabilidade térmica dos derivados coimobilizados foi calculada conforme metodologia do item 4.3.2.5.

### 5.3.2.9 Ensaio de estabilidade dos derivados enzimáticos frente a diferentes pHs

A estabilidade frente a diferentes pHs dos derivados coimobilizados foi calculada conforme metodologia do item 4.3.2.6.

### 5.3.2.10 Ensaio de Dessorção da $\beta$ -D-Galactosidase

A força de adsorção da lipase sobre o suporte NPM-TLL- $\beta$ Gal foi determinada a partir de sua dessorção com solução iônica de NaCl, com concentrações variando de 25 a 200 mM. A atividade hidrolítica da suspensão e do sobrenadante foi medida em intervalos de tempo de 30 minutos.

### 5.3.2.11 Identificação das Proteínas Coimobilizadas e Confirmação do Mecanismo de Imobilização

A identificação das proteínas coimobilizadas, bem como a confirmação do mecanismo de imobilização foi realizada através de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Hames (1998). As amostras foram preparadas suspendendo 100 mg em 1 mL de tampão fosfato de sódio 25mM, posteriormente ressuspendendo 20  $\mu$ L desta amostra em 20  $\mu$ L do tampão de ruptura (glicerol 27 %, SDS 6 %,  $\beta$ -mercaptoetanol 10 % e azul de bromofenol 0,01 % em tampão Tris-HCl 0,12 M pH 6,8) e aquecidas durante 5 min em água fervente.

Foi utilizado um gel com 12 % de poliacrilamida na zona de separação e um gel de 5 % de poliacrilamida na zona de concentração. O eletrólito utilizado no reservatório da cuba eletrolítica foi composto por tampão Tris 0,025 M, glicina 0,192 M e SDS 0,1 %, em pH 8,3, e a corrente elétrica mantida em mantida em 150 V.

Após a corrida, os géis foram corados com *coomassie brilliant blue* R- 250 0,1 % (m/v) em metanol: ácido acético: água (4:1:5, v/v/v) por pelo menos 1 h, e descorados com uma solução de etanol: ácido acético: água (3:1:6, v/v/v), até a visualização das bandas protéicas.

As proteínas foram identificadas através da comparação do peso molecular com marcador padrão de proteínas de baixa e alta massa molecular na faixa de 10-250 kDa (BioRad).

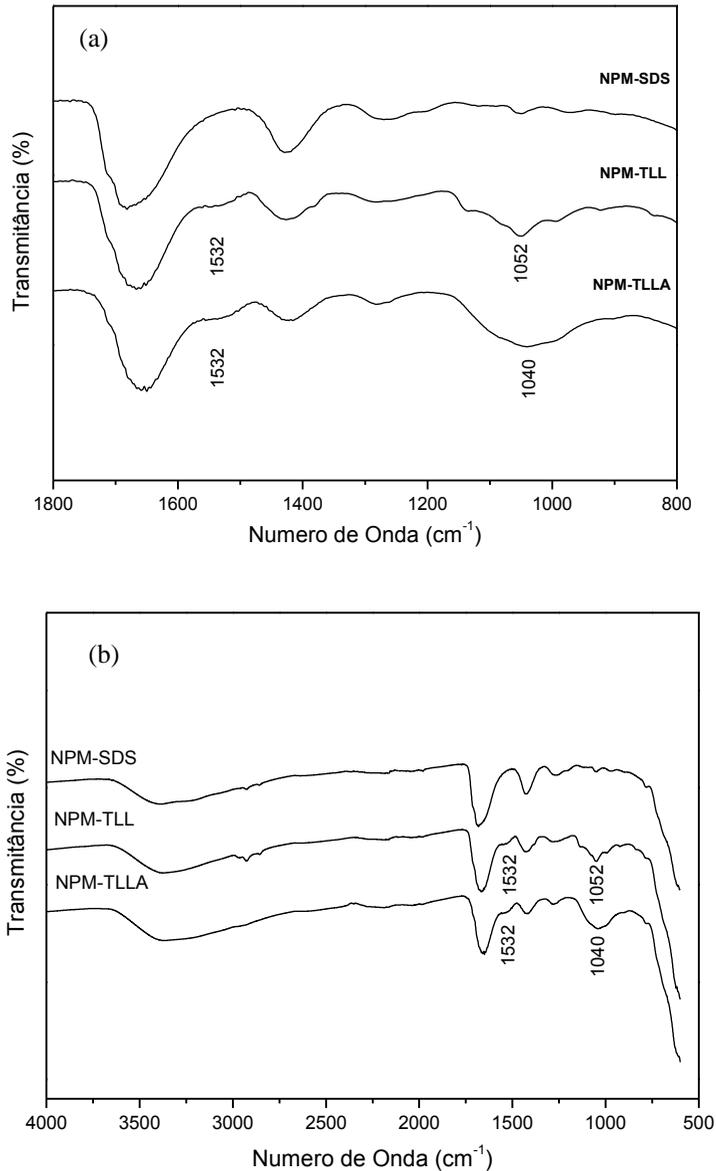
## 5.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.4.1 Aminoação Química do Derivado NPM-TLLA

A modificação dos grupos carboxílicos do derivado NPM-TLL através da reação de aminoação química foi confirmada através das análises de FTIR-ATR (Figura 28 a-b), evidenciada por modificações nas regiões de 1532 e 1040  $\text{cm}^{-1}$ , em destaque no espectrograma da Figura 28b.

Na primeira região, a deformação fraca similar a um “ombro” em 1532  $\text{cm}^{-1}$  nos derivados NPM-TLL e NPM-TLLA e ausente para a NPM-SDS, pode ser atribuída às ligações N-H das aminas secundárias presentes na lipase (ZDARTA et al., 2015). Já na segunda região, existe uma deformação larga em 1040  $\text{cm}^{-1}$  visível para o derivado modificado NPM-TLLA que indica a presença de ligações N-H proveniente das aminas primárias presentes nos grupos adicionados ao derivado NPM-TLL durante a modificação com EDA. Esta banda difere da observada em 1052  $\text{cm}^{-1}$  no espectro da NPM-TLLA, atribuída a vibração do grupo C-O proveniente dos grupos carboxílicos da lipase, modificados posteriormente através da aminoação (SILVERSTEIN; WEBSTER, 1998; ZDARTA et al., 2015).

Figura 28- Espectrograma obtido por FTIR-ATR do suporte NPM-SDS e dos derivados NPM-TLL e NPM-TLLA (a), destacando a região entre 500-1750  $\text{cm}^{-1}$ (b).



Após a reação de aminação, atividade recuperada do derivado NPM-TLLA foi de aproximadamente a metade da atividade recuperada do derivado NPM-TLL antes da reação com EDA e EDC, conforme os dados apresentados na Tabela 7.

Tabela 7- Atividade específica e recuperada da TLL antes e depois da aminação química com EDA.

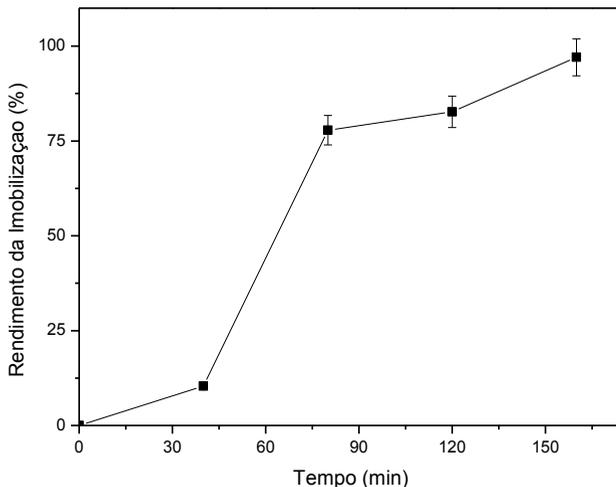
Enzima	Atividade Específica (U/g)	Atividade Recuperada (%)
TLL livre	240,0	-
NPM-TLL	1240,0	516,0
NPM-TLLA	640,0	266,6

Apesar de uma leve redução na atividade recuperada do derivado, não foram observados alterações desta ordem na sua estabilidade, conforme observado nos resultados de estabilidade que serão apresentados a seguir. Além do mais, esta perda de atividade é recompensada levando-se em conta a hiperativação da lipase durante a imobilização no suporte NPM-SDS. Embora fosse esperado um incremento na atividade química do derivado seguindo esta metodologia (FERNANDEZ-LORENTE *et al.*, 2008; MARCIELLO *et al.*, 2014; RODRIGUES *et al.*, 2009c), este resultado é considerável satisfatório quando comparado com outras classes de enzimas como, por exemplo, para a penicilina G acilase e glutaril acilase, onde a estabilidade da enzima sofre severos prejuízos sendo possível modificar somente 50 % dos grupos carboxílicos superficiais (HOARE; OLSON; KOSHLAND, 1968; LÓPEZ-GALLEGO *et al.*, 2005). Sendo assim, o derivado NPM-TLLA pode ser utilizado para as etapas subsequentes deste trabalho.

#### 5.4.2 Coimobilização da $\beta$ -D-galactosidase no derivado NPM-TLLA

A enzima de  $\beta$ Gal foi imobilizada no derivado NPM-TLLA, obtendo rendimentos de imobilização de até 98 % após 150 min de incubação (Figura 29). O derivado coimobilizado foi obtido com uma atividade específica para a  $\beta$ Gal de  $1156,0 \pm 57,8$  U/g (concentração de proteínas de 0.5 mg/mL), o que representa uma atividade recuperada de 85 % em relação a atividade hidrolítica fornecida no início da imobilização, de  $1360,0 \pm 68,0$  U/g

Figura 29- Rendimento de imobilização da  $\beta$ -D-galactosidase no suporte NPM-TLLA, utilizando concentração de 1 mL  $\beta$ -Gal e 1 g NPM-SDS-1 (0,25 mg proteína. mL<sup>-1</sup>), em temperatura ambiente.



A capacidade máxima de adsorção da  $\beta$ Gal no suporte NPM-TLLA foi avaliada utilizando concentrações de proteína variando de 0,13-1,83 mg/mL, de acordo com a Tabela 8.

Tabela 8- Carga máxima de proteína adsorvida no derivado aminado NPM-TLLA, mediante diferentes concentrações de  $\beta$ Gal. Condições experimentais: temperatura ambiente, 1h, pH 7,0.

NPM-SDS (g)	V <sub><math>\beta</math>Gal</sub> ( $\mu$ L)	V <sub>PBS</sub> (mL)	P (mg/mL)	P <sub>T</sub> (mg)	P <sub>I</sub> (mg)	P <sub>I</sub> (%)	CM (mg/g)
0,3	30	6	0,13	0,79	0,75	95	2,5
0,3	60	6	0,29	1,73	1,70	98	5,6
0,3	90	6	0,46	2,76	2,72	98	9,0
0,3	450	6	1,83	10,98	6,34	58	21,1

\*P = concentração de proteínas em solução; P<sub>T</sub> = massa total de proteína; P<sub>I</sub> = massa de proteína imobilizada; CM = capacidade máxima de proteína adsorvida no suporte.

Conforme os rendimentos de coimobilização obtidos para a  $\beta$ Gal (NPM-TLL- $\beta$ Gal) tem-se que para concentrações iniciais de até 0,46 mg<sub>proteína</sub>/mL, o rendimento de imobilização chega a 98 %, resultando em uma carga máxima de proteínas imobilizadas de 9,0 mg<sub>proteína</sub>/g<sub>NPM-SDS</sub>. Para concentrações superiores a esta, foi observada a dessorção de aproximadamente 11,0 % da TLL imobilizada.

Levando em conta o alto peso molecular da  $\beta$ Gal, em torno de 200 kDa, é possível que a alta concentração de proteínas em solução tenha contribuído para deslocar a lipase adsorvida no suporte (com cerca de 45 kDa) através de interações entre a lipase e a  $\beta$ Gal. Desta forma, para os demais testes realizados foi escolhido trabalhar com concentrações de no máximo 0,5 mg<sub>proteína</sub>/mL.

A imobilização da  $\beta$ Gal também foi testada diretamente no suporte NPM-SDS para avaliar a possibilidade de a imobilização ocorrer diretamente no suporte, ao invés de formar interações com a lipase aminada. A imobilização foi realizada nas mesmas condições aplicadas no derivado aminado e, após a finalização do processo, o derivado foi ressuspensionado em PBS. Foi observado que, embora inicialmente adsorvida, a  $\beta$ Gal não foi capaz de permanecer imobilizada no suporte após 30 min sob agitação moderada, indicando uma interação entre enzima e suporte muito fraca e momentânea. Desta forma, pode-se confirmar que a imobilização ocorre através da interação entre a  $\beta$ Gal e a TLL modificada com grupos amino.

A dessorção da  $\beta$ Gal a partir do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal foi realizada para avaliar a possibilidade de regeneração do suporte após inativação das enzimas coimobilizadas. No entanto, assim como a TLL, não foi possível dessorver a  $\beta$ Gal em nenhuma das concentrações de NaCl avaliadas (25-200 mM). Acompanhando a atividade hidrolítica e concentração de proteínas no sobrenadante e na suspensão estudada, não foi detectada a presença de proteínas em ambos os casos. Assim, pode-se dizer que a  $\beta$ Gal se ligou fortemente à lipase.

A estratégia adotada para a imobilização da  $\beta$ Gal em suportes magnéticos apresenta como vantagem as condições brandas de imobilização em relação às técnicas frequentemente adotadas que utilizam agentes ativadores para a ativação do suporte como em métodos de imobilização por ligação covalente (LIU *et al.*, 2012; ZHANG; GAO; GAO, 2010). Além do mais, através deste protocolo não é necessário possuir grupos reativos na superfície da nanopartícula magnética, evitando assim etapas adicionais de ativação do suporte (PAN *et al.*, 2009).

### 5.4.3 Caracterização do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal

#### 5.4.3.1 Estabilidade Térmica do derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal

O derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal apresentou uma maior estabilidade térmica quando comparado com o derivado CNBr- $\beta$ Gal. A 30 °C o

derivado coimobilizado mostrou-se estável, enquanto o derivado CNBr- $\beta$ Gal apresentou uma redução de atividade de aproximadamente 20 % em relação a sua atividade inicial já nas primeiras 2,5 h. Para as temperaturas de 40 e 50 °C o derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal teve uma redução de atividade de cerca de 60 % após 5 h de incubação e mantendo-se estável pelas 3 h seguintes. Porém, quando comparada com o CNBr- $\beta$ Gal, a coimobilização da  $\beta$ Gal na lipase modificada conferiu ganhos de estabilidade térmica consideráveis à enzima. A  $\beta$ Gal, tendo como referencial a atividade inicial dos derivados no início da análise, definido como 100 %.

Em relação à estabilidade térmica da TLL coimobilizada com a  $\beta$ Gal no derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal, não houve alterações em relação a sua estabilidade térmica nas temperaturas estudadas, de acordo com a Figura 31, mantendo um comportamento semelhante ao encontrado para o derivado NPM-TLL. Este resultado demonstra que a etapa de aminação química não afetou a estabilidade operacional da lipase nesta faixa de temperaturas. A TLL apresentou, adicionalmente, uma leve hiperativação a 30 e 40°C.

A Figura 30 apresenta a comparação da atividade recuperada dos derivados CNBr-  $\beta$ Gal e NPM-TLL-  $\beta$ Gal, tendo como referencial a atividade inicial dos derivados no início da análise, definido como 100 %.

Em relação à estabilidade térmica da TLL coimobilizada com a  $\beta$ Gal no derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal, não houve alterações em relação a sua estabilidade térmica nas temperaturas estudadas, de acordo com a Figura 31, mantendo um comportamento semelhante ao encontrado para o derivado NPM-TLL. Este resultado demonstra que a etapa de aminação química não afetou a estabilidade operacional da lipase nesta faixa de temperaturas. A TLL apresentou, adicionalmente, uma leve hiperativação a 30 e 40°C.

Figura 30- Comparação da estabilidade térmica do derivado NPM- $\beta$ Gal e CNBr- $\beta$ Gal em pH 7,0, temperaturas de 30, 40 e 50°C, durante 8h de reação.

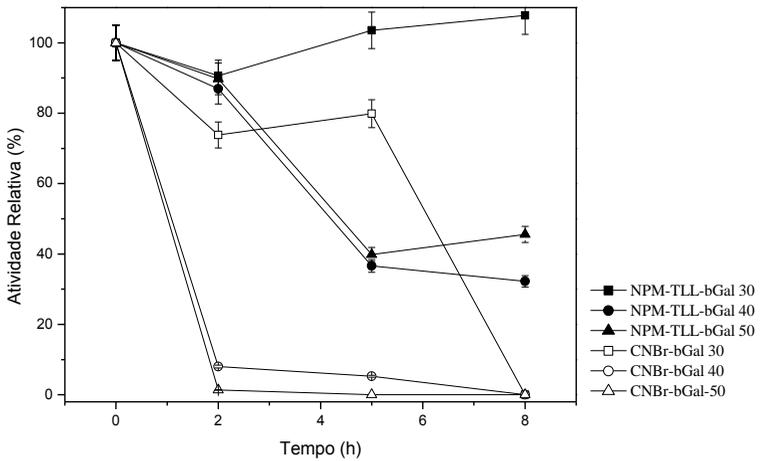
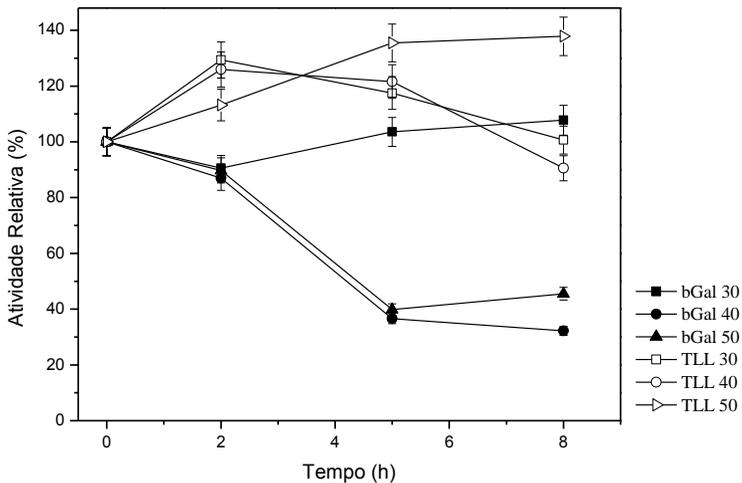


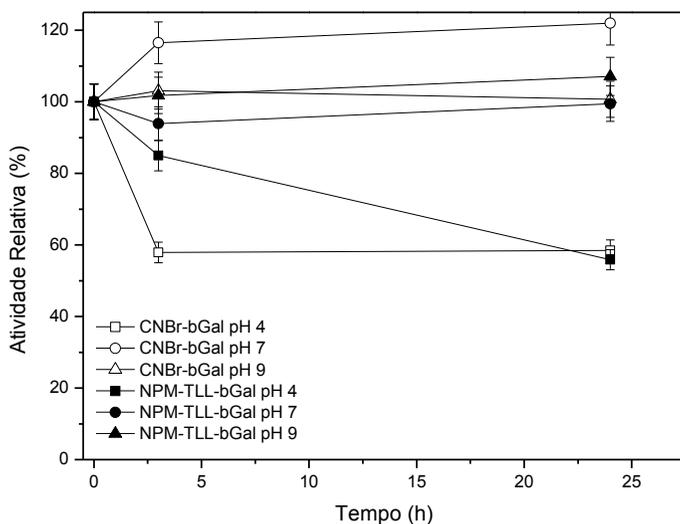
Figura 31- Estabilidade térmica das enzimas TLL e  $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas no derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal, em pH 7,0 nas temperaturas de 30, 40 e 50 °C, durante 8 h de reação.



### 5.4.3.2 Estabilidade do derivado NPM-TLL-βGal em diferentes valores de pH

A βGal imobilizada no derivado NPM-TLLA apresentou um comportamento muito similar ao derivado CNBr-βGal. A maior diferença de comportamento ocorreu em pH 7,0, no qual a enzima livre apresentou-se uma maior estabilização. Comparando os valores de atividade relativa das duas amostras, percebe-se que a imobilização não causou alterações conformacionais na enzima, capazes de alterar suas propriedades em termos de estabilidade na faixa de pH estudada.

Figura 32- Comparação da estabilidade dos derivados NPM-TLL-βGal e CNBr-βGal em diferentes valores de pH.



### 5.4.4. Entrecruzamento de ligações do derivado NPM-TLL-βGal

Após a coimobilização da TLL e βGal, foi avaliado o efeito do entrecruzamento de ligações com glutaraldeído e dextrano-aldeído na estabilidade dos derivados coimobilizados. A Tabela 9 apresenta os valores de atividade específica e atividade recuperada para os derivados coimobilizados, entrecruzados com glutaraldeído nas concentrações 0,5% e 1,0% (v/v) (NPM-TLL-βGalG05 e NPM-TLL-βGalG1, respectivamente) e dextrano-aldeído de 40 kDa (NPM-TLL-βGalD).

O derivado menos afetado de forma global pelas condições reacionais foi o derivado tratado com 0,5% de glutaraldeído, NPM-TLL-βGalG05, que, ao final do processo, apresentou 85% e 75% de atividade recuperada das enzimas TLL e βGal, respectivamente. O derivado NPM-TLL-βGalD foi o que apresentou uma menor atividade recuperada, retendo somente 61% da atividade inicial da TLL e 50% na βGal. No entanto, o derivado que apresentou a maior atividade recuperada para a βGal foi o derivado NPM-TLL-βGalG1, mesmo apresentando apenas 67% da atividade da TLL após o entrecruzamento.

Tabela 9- Atividade específica e recuperada das enzimas TLL e βGal nos derivados coimobilizados e entrecruzados.

Enzima	Atividade Específica (U/g)		Atividade Recuperada(%)	
	TLL	βGal	TLL**	βGal***
NPM-TLL-βGal*	492,0	1156,0	82,0	85,0
NPM-TLL-βGalD	366,0	578,0	61,0	50,0
NPM-TLL-βGalG05	510,0	580,0	85,0	75,0
NPM-TLL-βGalG1	402,0	1075,0	67,0	93,0

\* Os valores referem-se a concentração de βGal de 0,5mg<sub>proteína/g</sub> suporte.;

\*\*A atividade recuperada da TLL é relativa a atividade específica desta enzima no derivado NPM-TLLA, antes da coimobilização; \*\*\* A atividade recuperada da βGal é relativa a atividade específica fornecida na imobilização.

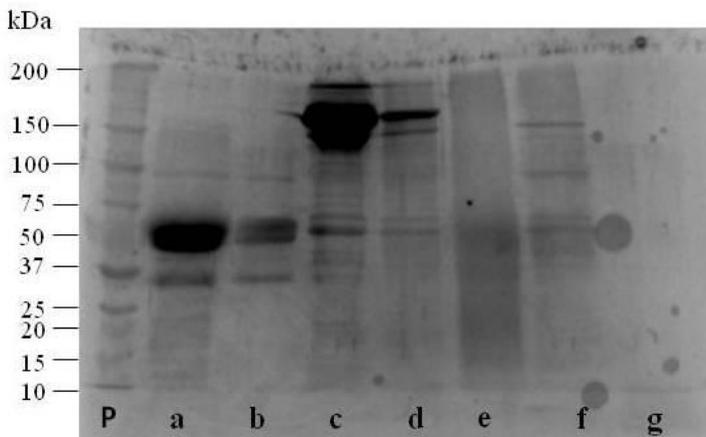
Através da eletroforese em gel de poliacrilamida 12 % (SDS-PAGE) foi possível confirmar a coimobilização da TLL e da βGal nos derivados enzimáticos. Para a identificação das proteínas, foi utilizado um padrão de peso molecular (P) (Figura 33).

Na banda referente ao derivado NPM-TLL-βGal (d) pode-se visualizar a presença da TLL e da βGal, demonstrando que as mesmas foram desorvidas após a reação com β-mercaptoetanol e SDS. Isto indica que o tipo de ligação existente entre as enzimas e o suporte é do tipo não covalente. Nas bandas referentes aos derivados reticulados NPM-TLL-βGalD (e) e NPM-TLL-βGalG1 (g) não é possível identificar nenhuma das duas proteínas, confirmando que as enzimas foram reticuladas através da formação de ligações covalentes. Já para o derivado NPM-TLL-βGalG05 (f), pode-se concluir que a formação de ligações cruzadas entre as proteínas e o suporte não ocorreu de forma eficiente, pois percebe-se a presença de subunidades da βGal.

Conforme discutido no capítulo 4, a imobilização da TLL no suporte NPM-SDS ocorre através de mecanismos de adsorção.

Analisando a banda referente ao derivado NPM-TLL (b) pode-se confirmar este resultado através da presença da banda referente à lipase.

Figura 33- SDS-PAGE dos derivados coimobilizados de TLL e  $\beta$ -DGalactosidase, onde: P) é o padrão de proteínas, a) TLL livre, b) NPM-TLL, c)  $\beta$ Gal livre, d) NPM-TLL-  $\beta$ Gal, e) NPM-TLL-  $\beta$ GalD, f)NPM-TLL-  $\beta$ GalG05 e g) NPM-TLL-  $\beta$ GalG1.



#### 5.4.4.1 Estabilidade térmica dos derivados entrecruzados

A estabilidade térmica dos derivados entrecruzados foi realizada para faixas de temperatura entre 50 e 80°C. A Tabela 10 apresenta os valores de atividade relativa das enzimas TLL e  $\beta$ Gal para as temperaturas de 50 e 60°C ao final de 8h de incubação, onde a atividade inicial foi considerada 100%. Os resultados apresentam os valores médios dos dados replicados, com desvio padrão menores que 5%.

Comparando os valores de atividade relativa do derivado imobilizado NPM-TLL- $\beta$ Gal com os derivados entrecruzados, nota-se um incremento na estabilidade térmica da  $\beta$ Gal após a estabilização por entrecruzamento, sendo que a TLL manteve-se estável.

Como após 8h de incubação a 60°C as amostras dos derivados NPM-TLL- $\beta$ GalG05, NPM-TLL- $\beta$ GalG1 e NPM-TLL- $\beta$ GalD apresentaram 90, 75 e 50 % de atividade recuperada, respectivamente, a temperatura foi aumentada para 70 e 80 °C, permanecendo durante 3h em cada temperatura. A Figura 34 apresenta o comportamento dos derivados ao longo do tempo de incubação nas temperaturas de 60, 70 e

80°C, com os valores médios dos dados replicados apresentando desvio padrão inferior a 5 %

Tabela 10- Atividade relativa da TLL e  $\beta$ Gal livres e coimobilizadas nos derivados, ao final de 8h de incubação em temperaturas de 50 e 60°C.

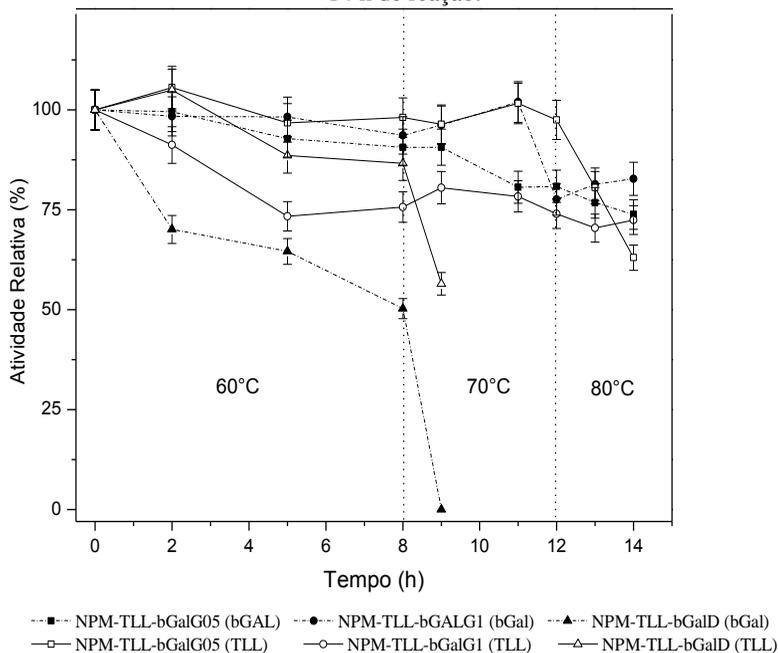
Enzima	Atividade Relativa (%) a 50°C		Atividade Relativa (%) a 60°C	
	TLL	$\beta$ Gal	TLL	$\beta$ Gal
CNBr-TLL (TLL livre)	100	-	79,5	-
NPM-TLL	100	-	82,7	-
CNBr- $\beta$ Gal ( $\beta$ Gal livre)*	-	-	-	-
NPM-TLL- $\beta$ Gal	137,0	45,05	-	-
NPM-TLL- $\beta$ GalD	114,0	81,9	86,6	50,2
NPM-TLL- $\beta$ GalG05	104,0	81,9	98,8	90,6
NPM-TLL- $\beta$ GalG1	91,7	81,9	93,6	75,7

\* A  $\beta$ Gal livre é estável até 30°C.

Na Figura 34 observa-se que os derivados NPM-TLL- $\beta$ GalG05 e NPM-TLL- $\beta$ GalG1 mantiveram mais de 70% e 75% da atividade para a  $\beta$ Gal e TLL, respectivamente, após o aumento de temperatura. Comparativamente, a NPM-TLL- $\beta$ Gal apresentou 45 % de atividade recuperada após 8 h de incubação em 50 °C, levando a concluir que a estabilização com glutaraldeído foi eficiente em seu objetivo. Embora na Figura 33 se possa visualizar a presença de subunidades de proteínas da  $\beta$ Gal na banda de SDS-PAGE referente ao derivado NPM-TLL- $\beta$ Gal05, sugerindo que não houve a formação de ligações covalentes, o aumento na estabilidade nas condições avaliadas indica que, mesmo não ocorrendo uma total reticulação das enzimas, o tratamento conferiu efeitos positivos na termoestabilidade.

O derivado entrecruzado com dextrano-aldeído 40 kDa, foi o que apresentou um menor aumento na estabilidade térmica frente ao derivado sem tratamentos, com 50 % e 86,6 % de atividade recuperada para a  $\beta$ Gal e TLL, respectivamente, após 8 h de incubação a 60 °C. Após o aumento de temperatura para 70 °C houve a completa inativação da  $\beta$ Gal, em quanto a TLL permaneceu com 56 % de atividade. Este comportamento demonstra que a  $\beta$ Gal oferece a TLL uma proteção contra as condições reacionais, uma vez que a inativação da lipase ocorre de forma mais significativa após a inativação total da  $\beta$ Gal.

Figura 34- Comparação da estabilidade térmica das enzimas TLL e  $\beta$ -D-galactosidase coimobilizadas nos derivados NPM- $\beta$ Gal-Glu05, NPM- $\beta$ Gal-Glu1.0 e NPM-TLL- $\beta$ GalD, em pH 7,0, temperaturas de 60, 70 e 80°C, durante 14 h de reação.



O melhor resultado obtido com o glutaraldeído em termos de aumento da estabilidade térmica pode ser explicado pelo seu mecanismo de reação que, uma vez que é capaz de reagir intra e intermolecularmente com a proteína, pode afetar a estrutura das proteínas podendo torná-las mais rígidas. Este efeito pode ser tanto negativo quanto positivo, dependendo do caso (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009). Nesta situação, percebe-se que o uso de agentes estabilizantes proporcionou um resultado benéfico na estabilização do derivado coimobilizado.

A estratégia adotada mostrou ser bastante efetiva em relação a um aumento de estabilidade térmica, quando comparado com outros protocolos de imobilização reportados. Zhang, Gao e Gao (2010), por exemplo, obtiveram derivados imobilizados em nanopartículas magnéticas estáveis até temperaturas de 50 °C. Zhou e Dong Chen (2001) também reportaram esta temperatura como a máxima suportada pela  $\beta$ Gal imobilizada em uma superfície de grafite. Os resultados

obtidos aqui, no entanto, demonstram que através da metodologia estudada é possível aumentar a faixa de temperatura suportada pelo derivado em até 40 % em relação à  $\beta$ Gal livre.

#### 5.4.4.2 Estabilidade dos derivados entrecruzados em relação a diferentes valores de pH

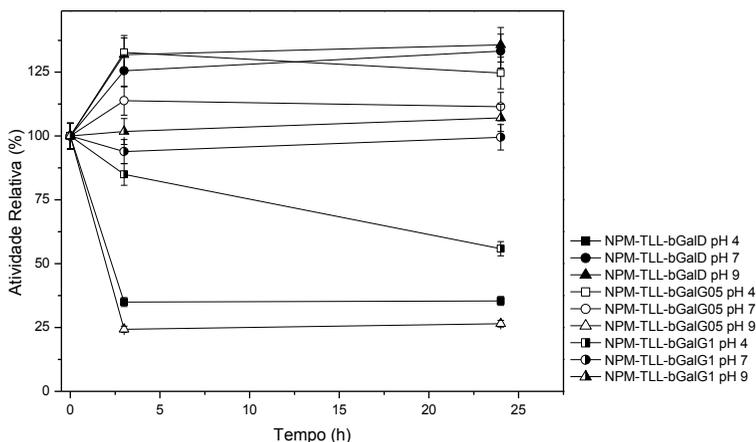
A estabilidade dos derivados coimobilizados foi avaliada em relação a sua estabilidade diante de diferentes valores de pH. A m pHs 4, 7 e 9.

Os derivados enzimáticos entrecruzados mostraram uma maior variação em relação à atividade recuperada da  $\beta$ Gal. De acordo com a Figura 35., a  $\beta$ Gal apresentou uma menor estabilidade em pH 4 nos derivados reticulados com dextrano-aldeído e glutaraldeído na concentração de 1,0 %, com uma atividade recuperada inferior a 40% no derivado NPM-TLL- $\beta$ GalD e 25 % para o NPM-TLL- $\beta$ GalG1. Já o derivado reticulado com uma menor concentração de glutaraldeído apresentou o pior desempenho em pH 9,0, tendo 50 % de sua atividade recuperada ao final do tempo de incubação. Este resultado demonstra, sobretudo, que os diferentes tipos de agentes de reticulação avaliados, bem como a concentração de glutaraldeído utilizada, afetam a estrutura da enzima de forma a modificar sua estabilidade em diferentes pHs, tanto de forma positiva, quanto negativa. Em um pH neutro, a  $\beta$ Gal mostrou-se totalmente estável, não apresentando perdas de atividade.

A TLL, no entanto, manteve-se estável retendo mais de 90% de sua atividade inicial ao final do tempo de incubação em todas as condições estudadas, seguindo um comportamento semelhante ao descrito no capítulo anterior.

A Figura 35 apresenta os valores de atividade relativa da  $\beta$ Gal nos derivados enzimáticos avaliados, referente a atividade da enzima no tempo zero, estabelecida como 100%. A estabilidade foi avaliada durante 24 h de incubação em pHs 4, 7 e 9.

Figura 35- Comparação da estabilidade dos derivados coimobilizados entrecruzados em diferentes valores de pH, em relação a atividade hidrolítica da  $\beta$ -D-galactosidase



### 5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A modificação do derivado NPM-TLL através de aminação química em estado sólido ocorreu de forma eficiente. Mesmo a lipase tendo apresentado apenas 50 % de atividade recuperada após a etapa de aminação, a estabilidade da mesma frente a diferentes condições de temperatura e pH permaneceram constantes, permitindo o uso do derivado aminado para a coimobilização da  $\beta$ Gal.

A  $\beta$ Gal, imobilizada através de um mecanismo de intercâmbio iônico, foi coimobilizada com um rendimento de 98% e atividade específica de  $1156,0 \pm 57,8$  U/g para a  $\beta$ Gal e  $640,0 \pm 32,0$  U/g para a TLL, para a concentração de  $\beta$ Gal de  $0,5 \text{ mg}_{\text{proteína}}/\text{g}_{\text{suporte}}$  (concentração selecionada para estudo). Para concentrações de proteínas da  $\beta$ Gal superiores a este valor, houve a dessorção de cerca de 11 % da TLL adsorvida.

O processo de imobilização melhorou a estabilidade térmica da  $\beta$ Gal, mantendo sua estrutura inalterada em até  $50^\circ\text{C}$ , comparando com a enzima livre que se apresentou estável somente até  $30^\circ\text{C}$ . Para os derivados entrecruzados, esta estabilização foi ainda maior, sendo possível trabalhar em faixas de temperatura de até  $70^\circ\text{C}$  para os derivados entrecruzados com glutaraldeído. Já o uso de dextrano-aldeído resultou em uma menor atividade recuperada das enzimas coimobilizadas, não aumentando significativamente a estabilidade

térmica do derivado entrecruzado quando comparado ao NPM-TLL- $\beta$ Gal.

De forma geral, o entrecruzamento das proteínas através de agentes de reticulação pós-imobilização proporcionou uma maior aplicabilidade frente a condições reacionais mais intensas, o que pode ser considerado uma vantagem para a utilização destes derivados em processos industriais.

Embora não tenha sido possível desorver a  $\beta$ Gal do suporte, e, conseqüentemente, recuperar o derivado NPM-TLL para futuras reutilizações, o aumento significativo de estabilidade conferido pela coimobilização da TLL e  $\beta$ Gal, é um ponto positivo e relevante neste processo, confirmando a eficiência dos métodos adotados.



## 6 MODIFICAÇÃO QUÍMICA DO DERIVADO ENZIMÁTICO NPM-TLL E COIMOBILIZAÇÃO DA $\alpha$ -QUIMOTRIPSINA

### 6.1 INTRODUÇÃO

A aplicação de diferentes metodologias de imobilização, assim como a combinação de duas ou mais metodologias, permite a obtenção de derivados enzimáticos altamente estáveis. Quando se tratando de enzimas multiméricas, a seleção do método de imobilização apropriado pode auxiliar, ainda, a evitar a dissociação de subunidades de proteína durante a aplicação em sistemas reacionais. A avaliação de diferentes protocolos permite realizar diferentes tipos de interação entre a estrutura e o sítio ativo da enzima com o suporte, influenciando, assim, nas características finais do derivado obtido (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; MATEO et al., 2007; PESSELA et al., 2007).

Conforme já discutido no Capítulo V, o glutaraldeído possui uma grande versatilidade de aplicação dentro dos processos de imobilização, podendo ser utilizado não somente como um agente de reticulação, mas também como um agente ativador através de grupos amino de um suporte enzimático (BARBOSA et al., 2012, 2014; BETANCOR et al., 2006b). Seguindo esta estratégia, este reagente pode ser aplicado para ativar o derivado NPM-TLLA obtido através da modificação química da lipase TLL imobilizada nas nanopartículas magnéticas NPM-SDS.

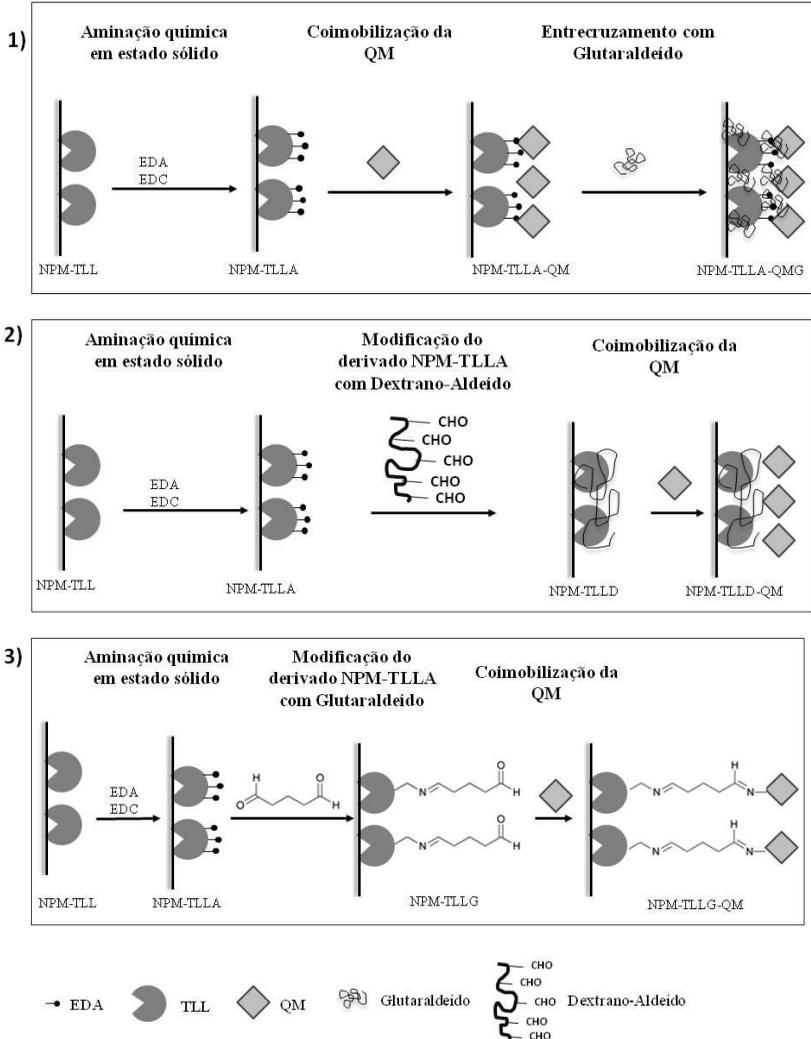
Já o dextrano-aldeído, além de ser utilizado como um agente de entrecruzamento pós-imobilização, pode também ser aplicado como um agente “espaçador”, minimizando possíveis impedimentos estéricos entre o sítio ativo das proteínas imobilizadas e substratos macromoleculares (GUISAN et al., 1998). Adicionalmente, o dextrano possui um caráter hidrofílico e o recobrimento do derivado NPM-TLLA com este polímero permite alterar a característica inicial do suporte e, assim, aumentar a sua versatilidade frente às diferentes possibilidades de aplicação na imobilização de enzimas (CASTILHO; DECKWER; ANSPACH, 2000).

Neste capítulo, diferentes formas de modificação do derivado aminado NPM-TLLA foram avaliadas, aplicando os novos suportes derivatizados na imobilização da enzima  $\alpha$ -quimotripsina (QM). O derivado enzimático NPM-TLLA foi modificado com dextrano-aldeído, e também ativado com glutaraldeído, com o objetivo de ampliar as possibilidades de aplicação da NPM-SDS a fim de obter um suporte

## *Capítulo VI*

enzimático versátil para a coimobilização de enzimas. A Figura 36 mostra uma representação esquemática das metodologias desenvolvidas.

Figura 36- Esquema das metodologias aplicadas na coimobilização da TLL e QM, onde 1) é a coimobilização a QM no derivado NPM-TLLA e o entrecruzamento do derivado coimobilizado com glutaraldeído; 2) é a modificação do derivado NPM-TLLA com dextrano-aldeído e a coimobilização da QM; e 3) é a ativação do derivado NPM-TLLA com glutaraldeído e a coimobilização da QM.



Fonte: Desenvolvido pela autora.

## 6.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coimobilizar a enzima  $\alpha$ -quimotripsina (QM) no derivado enzimático NPM-TLL;
- Coimobilizar a QM no derivado enzimático aminado NPM-TLLA;
- Modificar o derivado NPM-TLLA com dextrano-aldeído e coimobilizar a QM;
- Modificar o derivado NPM-TLLA com glutaraldeído e coimobilizar a QM;
- Estabilizar os derivados coimobilizados através de entrecruzamento de ligações com glutaraldeído;
- Caracterizar os derivados produzidos em relação a sua estabilidade térmica e em diferentes valores de pH;
- Avaliar a força de união das enzimas em relação ao suporte magnético.

## 6.3 MATERIAIS E MÉTODOS

### 6.3.1 Materiais

A enzima selecionada para este estudo foi a  $\alpha$ -quimotripsina (QM) de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich). Para a modificação química dos derivados enzimáticos foram utilizados dextrana (1,5 kDa) (Sigma-Aldrich), glutaraldeído (VWR Chemicals) e membranas para diálise tamanho 2 (Medicell Membranes). Como substrato para determinação da atividade hidrolítica dos derivados foi utilizado substrato N-benzoil-L-tirosina-paranitroanilida (BTNA) (Sigma-Aldrich). Para a dessorção da QM foram usados CTAB, MS e Triton X100 (VWR Chemicals).

### 6.3.2 Métodos

#### 6.3.2.1 Coimobilização da $\alpha$ -Quimotripsina no Derivado NPM-TLL e NPM-TLLA

A QM foi coimobilizada no suporte NPM-TLL (não aminado) e no suporte NPM-TLLA (aminado), com o intuito de comparar a eficiência das abordagens estudadas. Em ambos os suportes, a QM foi imobilizada conforme o item descrito em 5.3.2.1. O processo de

imobilização foi acompanhado através do acompanhamento do decréscimo da atividade hidrolítica no sobrenadante, conforme metodologia descrita no item 6.3.2.6.

#### 6.3.2.2 Modificação do Derivado NPM-TLLA com Dextrano-aldeído e Coimobilização da $\alpha$ -Quimotripsina

Inicialmente, realizou-se a completa oxidação do dextrano (1,5 kDa) conforme metodologia descrita no item 5.3.2.1. Após a preparação do dextrano-aldeído, o derivado aminado NPM-TLLA foi modificado utilizando 1 g de NPM-TLLA em 10 mL de uma solução 30% de dextrano-aldeído em PBS 25 mM (pH 7,0) (v/v). A suspensão foi agitada durante 15 h à 4 °C em ambiente protegido da luz. Ao final, o derivado modificado foi lavado com PBS 100 mM (pH 4,0), seguido de uma lavagem com tampão borato de sódio 100 mM (pH 9,0) e, por fim, lavado com solução de NaCl 0,5mM e água destilada (FUENTES et al., 2004).

O derivado modificado com dextrano-aldeído (NPM-TLLD) foi liofilizado e posteriormente utilizado para a coimobilização da QM, seguindo o mesmo procedimento adotado no item 6.3.2.1.

#### 6.3.2.3 Ativação do Derivado NPM-TLLA com Glutaraldeído e Coimobilização da $\alpha$ -Quimotripsina

A ativação do derivado NPM-TLLA com glutaraldeído foi realizado através da metodologia adaptada de Betancor *et al.* (2006), onde 1g de NPM-TLLA foi adicionado a uma solução de glutaraldeído em PBS 5 mM (pH 7,0) e agitada durante 1,5 h à 4°C em ambiente protegido da luz. Foram testadas soluções com concentrações de glutaraldeído variando entre 5-15% (v/v). Depois de decorrido o tempo de reação, o novo derivado modificado (NPM-TLLG) foi lavado primeiramente com PBS 5 mM (pH 7,0) e depois com água destilada abundantemente. O derivado foi liofilizado durante 24 h até total evaporação da água e a coimobilização da QM foi feita conforme o procedimento adotado no item 6.3.2.1.

#### 6.3.2.4 Entrecruzamento do Derivado Coimobilizado NPM-TLLA-QM

O derivado NPM-TLLA-QM foi selecionado para avaliar o efeito de estabilização através do entrecruzamento da TLL e QM com

glutaraldeído. A metodologia foi realizada conforme descrito no item 5.3.2.3, utilizando uma solução 0,5 % de glutaraldeído (v/v) durante 2 h de reação.

### 6.3.2.5 Imobilização da $\alpha$ -Quimotripsina em Suporte Comercial CNBr

A QM foi imobilizada no suporte comercial de sepharose 4CL ativado com brometo de cianogenio conforme descrito no item 4.3.2.2. O derivado CNBr-QM foi utilizado como referencial do comportamento da enzima livre, conforme mencionado anteriormente.

### 6.3.2.6 Determinação da Atividade Hidrolítica da $\alpha$ -Quimotripsina

A atividade hidrolítica da  $\alpha$ -quimotripsina foi determinada através de um aumento da absorbância na faixa de 405 nm, produzido pela hidrólise do substrato sintético BTNA. Para a reação, 50  $\mu$ L de amostra contendo a o extrato ou derivado enzimático foram adicionado a 2,5 mL de solução 50 mM de PBS ( pH 7,0) com 4 % de etanol, e 30  $\mu$ L de BTNA (40 mM em hexano :dioxano 1:1 (v/v)). A absorbância foi medida em um espectrofotômetro UV/VIS (Hitachi modelo U-2900) com agitação magnética e temperatura ajustada a 25 °C. Atividade hidrolítica e o rendimento experimental da imobilização foram calculados conforme as Equações 5 e 6, com fator de correlação de 5,15  $\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$  (PEDROCHE *et al.*, 2007).

### 6.3.2.7 Determinação do Teor de Proteínas no Preparado Enzimático de $\alpha$ -Quimotripsina

O teor de proteínas foi determinado conforme metodologia descrita no item 4.3.2.4.

### 6.3.2.8. Ensaio de Termoestabilidade do Derivado Enzimático

A estabilidade térmica dos derivados coimobilizados foi calculada conforme metodologia do item 4.3.2.5.

#### 6.3.2.9 Ensaio de Estabilidade dos Derivados Enzimáticos Frente a Diferentes pHs

A estabilidade frente a diferentes pHs dos derivados coimobilizados foi calculada conforme metodologia do item 4.3.2.6.

#### 6.3.2.10 Ensaio de Dessorção da $\alpha$ -Quimotripsina

A força de adsorção da lipase sobre o suporte NPM-TLLA-QM foi realizada conforme a metodologia descrita no item 4.3.2.4 utilizando os surfactantes CTAB, MS e Triton X em concentrações variando entre 0,5-1,0 %.

#### 6.3.2.11 Identificação das Proteínas Coimobilizadas e Determinação do Mecanismo de Imobilização

A identificação das proteínas coimobilizadas e a confirmação do mecanismo de imobilização foram realizadas conforme a técnica de eletroforese em gel de poliacrilamida descrita no item 5.3.2.10.

### 6.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 6.4.1 Coimobilização da QM nos Suportes Derivatizados da NPM-TLLA

Inicialmente, foi realizada a imobilização da QM no derivado NPM-TLL, seguindo um protocolo simples envolvendo adsorção iônica. Através deste protocolo, a coimobilização da QM rendeu um derivado enzimático instável, obtido através de interações bastante fracas. Após a secagem por liofilização, não foi observado atividade recuperada. Desta forma, o derivado obtido da coimobilização da QM no derivado NPM-TLLA, serviu como referência para avaliar os efeitos das modificações resultantes da ativação com glutaraldeído e modificação com dextrano-aldeído. A Tabela 11 lista os valores de atividade específica da TLL e QM antes das modificações realizadas, o rendimento de imobilização e a atividade recuperada.

Tabela 11- Atividade específica, rendimento de imobilização e atividade recuperada das enzimas TLL e QM nos derivados coimobilizados.

Enzima	A <sub>r</sub> da QM livre (U/g) *	A <sub>r</sub> (U/g)		RI (%)*		A <sub>R</sub> (%)	
		TLL	QM	TLL	QM	TLL	QM
NPM-TLLD-QM	36,7	275,5	24,7	91,7	100	92,0	67,4
NPM-TLLA-QM	40,2	324,3	33,7	-	98,5	117,4	83,8
NPM-TLLG10-QM	48,3	361,5	30,4	132,5	95,7	120,8	62,8
NPM-TLLG15-QM	45,0	472,4	26,3	-	95,5	158,6	58,5

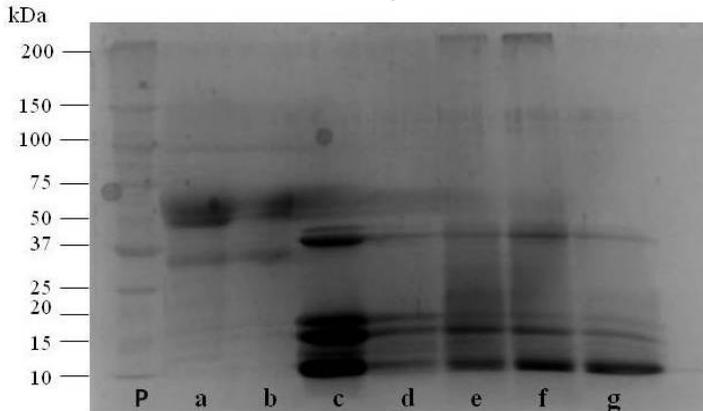
\* Quantidade de atividade fornecida no início da imobilização, com concentrações de proteína de aproximadamente 10 mg/mL.

A modificação do derivado NPM-TLLA com dextrano-aldeído foi realizada selecionando um dextrano de baixo peso molecular (1,5 kDa), a fim de evitar interações mais intensas entre a lipase e o suporte através de um enrijecimento da estrutura da enzima. Após a modificação, não foram observados alterações significativas na atividade recuperada da TLL no derivado modificado NPM-TLLD, mantendo 92,0 % da sua atividade inicial após 2 h de reação com o dextrano-aldeído. A metodologia proposta na literatura previa a reação durante 15 h. Porém, este tempo resultou na inativação da enzima, sendo reduzido para períodos mais curtos, o que promoveu resultados satisfatórios. A QM foi coimobilizada no derivado NPM-TLLD com 100 % de rendimento, apresentando uma atividade específica de 24,7 U/g. A atividade recuperada da QM no derivado, no entanto, foi de 67,4 %.

A ativação do derivado NPM-TLLA utilizando soluções de glutaraldeído em concentrações de 10 e 15% (NPM-TLLG10 e NPM-TLLG15) promoveu uma hiperativação da TLL, que teve uma atividade recuperada de 120,8 e 158,6 %, respectivamente, em relação a atividade inicial do derivado NPM-TLLA antes da reação. Em ambos os derivados, a coimobilização da QM aconteceu com mais de 95 % de rendimento, sendo a atividade específica do derivados NPM-TLLG10-QM de 30,4 U/g, o que representa 62,8% de atividade recuperada ao final da imobilização. Já o derivado NPM-TLLG15 teve uma atividade específica para a QM de 26,3 U/g, equivalente a 58,5% de atividade recuperada.

Através da SDS-PAGE (Figura 37) pode-se confirmar a coimobilização da TLL e da QM nos suportes derivatizados.

Figura 37- SDS-PAGE dos derivados coimobilizados de TLL e quimotripsina, onde: P) é o padrão de proteínas; a) a TLL livre, b) o NPM-TLL, c) a QM livre, d) o NPM-TLLA-QM, e) o NPM-TLLG10-QM e f) o NPM-TLLG15-QM e g) o NPM-TLLD-QM.



A presença de bandas características da TLL e da QM na linha do derivado NPM-TLLA-QM demonstra que as enzimas foram imobilizadas através de um mecanismo de adsorção. Nos derivados NPM-TLLG10, NPM-TLLG15 e NPM-TLLD, que envolveram a modificação da lipase através de glutaraldeído e dextrano-aldeído, é visível o desaparecimento da banda característica da lipase para os derivados modificados com glutaraldeído (banda e-f) e dextrano-aldeído (banda g). Este desaparecimento é causado pela formação de ligações covalentes entre a TLL e as nanopartículas através dos agentes de reticulação utilizados.

A coimobilização da TLL e QM através da modificação do derivado NPM-TLLA com dextrano-aldeído era esperada através de um mecanismo envolvendo ligações reversíveis de alta intensidade covalentes entre os resíduos de aminoácidos da QM e os grupos aldeído do agente polifuncional (FUENTES et al., 2004; MATEO et al., 2006a). Analisando a SDS-PAGE, não foi observada a presença de ligações covalente NPM-TLLD-QM.

Um ponto importante que deve ser salientado a respeito da modificação do derivado com dextrano-aldeído aplicado para a coimobilização de outra proteína, diz respeito a etapa de redução dos grupos aldeído que não reagiram ao final da imobilização. O protocolo no qual se baseia esta estratégia, sugere a realização de uma reação de redução das ligações formadas entre os grupos amino primários da

proteína com os grupos aldeídos do dextrano oxidado que não reagiram ao final da imobilização (FUENTES et al., 2004; MATEO et al., 2006b; PENZOL et al., 1998; PESSELA et al., 2004; PIZARRO et al., 2012). Esta redução é feita através da adição de borohidreto de sódio 1% (m/v) e visa à eliminação de grupos aldeído e ligações amino-aldeído remanescentes, tornando as ligações entre proteína-suporte ou, neste caso, proteína-proteína, em ligações bastante estáveis (FERNÁNDEZ-LAFUENTE et al., 1999). No entanto, esta etapa não foi realizada neste trabalho visando evitar a redução das nanopartículas magnéticas compostas por magnetita e, assim, a modificação estrutural do suporte.

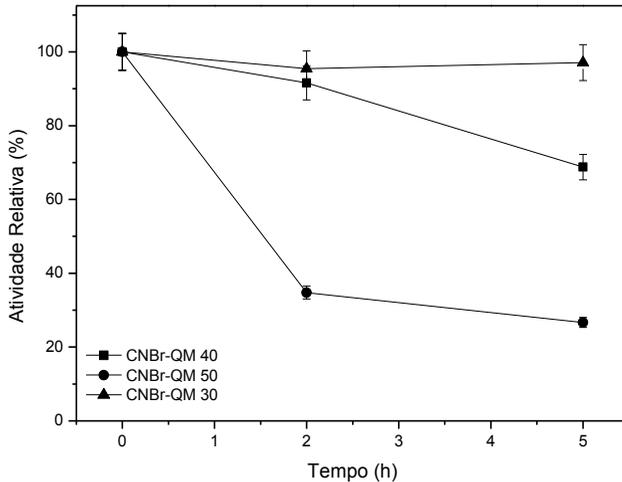
Em relação à dessorção da QM a partir do derivado NPM-TLLA-QM, esperava-se que, após a reticulação da TLL adsorvida nas nanopartículas magnéticas, fosse possível remover a QM com o auxílio de detergentes. Todavia, da mesma forma que nas metodologias abordadas nos capítulos anteriores, a dessorção não ocorreu de forma eficiente comprovando que a adsorção das enzimas estudadas ocorre sob ação de forças de alta intensidade. O Triton-X100, mesmo na menor concentração avaliada (0,5% v/v), desativou totalmente a QM nos primeiros 10 min de reação. Já o CTAB formou uma solução viscosa, não sendo possível separar o derivado do meio reacional.

### 6.4.2 Estabilidade Térmica dos Derivados Coimobilizados

A enzima livre, representada pelo derivado CNBr-QM utilizado como referencial, apresentou uma estabilidade máxima a 30°C, com uma atividade recuperada de 97 % após 5h de incubação. Acima desta temperatura, sua atividade recuperada reduziu gradativamente tendo somente 25% de atividade recuperada a 50°C após o mesmo período de incubação. A Figura 38 mostra o comportamento do derivado CNBr-QM nas temperaturas avaliadas, em termos de atividade relativa ao tempo inicial, que foi estabelecido como 100% de atividade.

Partindo deste referencial, pode-se dizer que a imobilização da QM nos derivados modificados de NPM-TLLA tornou sua estrutura menos propensa aos efeitos causados por temperaturas mais elevadas, pois todos os derivados avaliados apresentaram mais de 80% de atividade recuperada a 40°C.

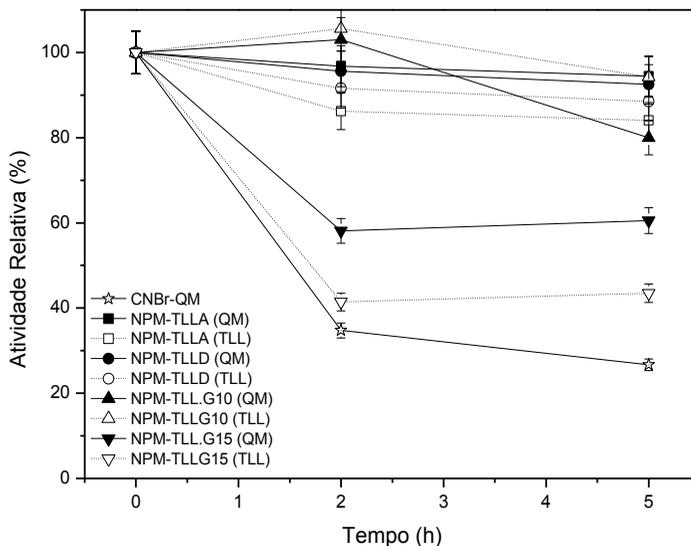
Figura 38- Estabilidade térmica do derivado CNBr-QM na faixa de temperatura de 30-50°C, durante 5h de incubação.



Na Figura 39, está descrito o comportamento de cada derivado sintetizado conforme as metodologias descritas, durante o período de 5h de incubação em temperatura de 50°C. Os resultados estão apresentados em termos de atividade relativa ao tempo inicial de análise, onde se estabeleceu 100 % de atividade.

O derivado no qual a ativação do NPM-TLLA foi realizada com solução de glutaraldeído 15 % (v/v) foi o que apresentou uma menor resistência térmica, mantendo somente 43,5 e 60,5 % da atividade recuperada para a TLL e QM, respectivamente, após 5 h de incubação a 50 °C. Correlacionando este resultado com o derivado ativado com uma solução de glutaraldeído 10% (v/v), no qual as enzimas TLL e QM tiveram 89 e 100% de atividade recuperada nas mesmas condições experimentais. Em temperaturas de 60°C durante 5h, o derivado NPM-TLLG10-QM, apresentou 56,6 % da atividade da QM, mantendo a atividade da TLL em 87 %. Analisando estes resultados, constata-se que uma maior concentração de glutaraldeído na etapa de ativação não conferiu efeitos positivos em relação à estabilidade da lipase, mesmo sendo observada uma maior atividade recuperada da TLL após a modificação. Este efeito pode ser consequência da ação intermolecular do glutaraldeído na TLL, que pode tornar sua estrutura pouco flexível e menos estável (BARBOSA et al., 2014; PIZARRO et al., 2012).

Figura 39- Estabilidade térmica das enzimas TLL e QM nos derivados coimobilizados, após 5h de incubação a 50°C.



Os derivados que apresentaram um melhor comportamento em relação à termoestabilidade foram o derivado aminado sem modificações com os agentes polifuncionais, NPM-TLLA-QM, e o derivado modificado antes da imobilização com dextrano-aldeído de 1,5 kDa, NPM-TLLD-QM. Este comportamento está dentro do esperado em relação ao uso do dextrano-aldeído como agente de reticulação, pois, dado o seu elevado tamanho molecular, ele não é capaz de reagir intermolecularmente com as proteínas e evitando assim possíveis alterações conformacionais, bem como a penetração deste reagente no sítio ativo da enzima (FERNANDEZ-LAFUENTE, 2009; PIZARRO et al., 2012).

Já o derivado NPM-TLLA-QM permaneceu com 82,4% da atividade da TLL e 97,6 % da QM, mesmo após 5 h a 60°C. Alguns trabalhos na literatura relatam resultados semelhantes no que diz respeito ao comportamento da QM nesta faixa de temperatura. Sustrova *et al.* (2009), por exemplo, obtiveram um derivado enzimático através da imobilização da QM em partículas magnéticas aminadas alcançando uma hiperativação da QM na ordem de 3 vezes na temperatura de 50 °C para o derivado imobilizado, ao passo que a enzima livre apresentou metade da sua atividade inicial em 37 °C. Este aumento de estabilidade térmica pós-imobilização também foi observado por Pedroche *et al.*

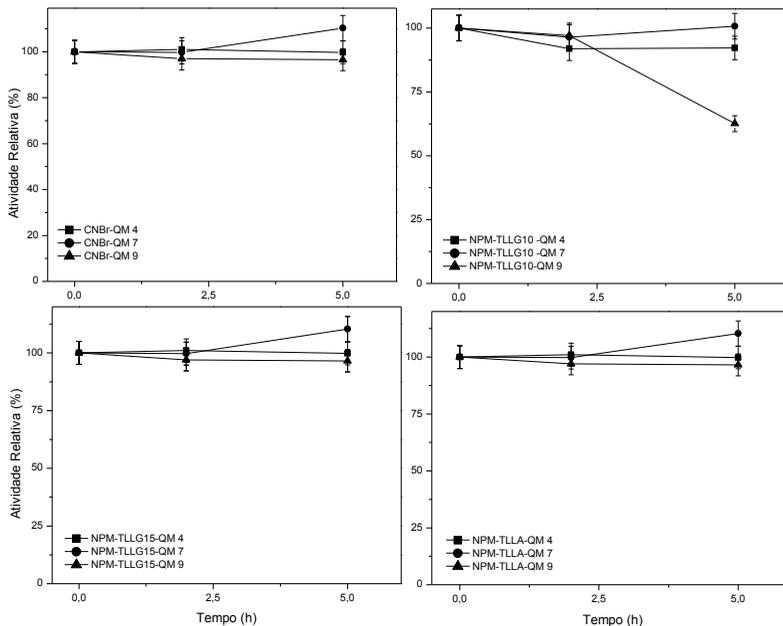
(2007) com a QM imobilizada em suportes de glioxil-agarose, permitindo o uso do derivado em temperaturas de 50-65°C.

#### 6.4.5 Estabilidade dos Derivados Coimobilizados em Diferentes Valores de pH

Os derivados coimobilizados através de diferentes modificações da NPM-TLLA não apresentaram perdas de atividade quando incubadas em pH 4, 7 e 9, bem como a enzima livre. A Figura 40 apresenta a atividade relativa da QM ao longo de 5h, considerando a atividade no tempo inicial como 100 %. O derivado NPM-TLLG10-QM apresentou apenas uma perda de atividade em pH 9,0 após 5 h de incubação, que não foi visualizada nos demais derivados. Como a TLL demonstrou uma alta estabilidade nos estudos anteriores, sua atividade recuperada foi determinada somente no início e no fim do período estudado em cada derivado, não demonstrando nenhuma alteração nos valores calculados.

Segundo dados descritos na literatura referentes ao comportamento da QM livre em diferentes valores de pH, a QM apresenta uma alta estabilidade principalmente em valores entre 7-9, nos quais não costuma ocorrer dissociação de suas subunidades. Já em pH extremamente ácidos, abaixo de 3, pode ocorrer a protonação da tríade catalítica, resultando em uma menor atividade (KUMAR; VENKATESU, 2012). Embora não tenha ocorrido uma desativação aparente em pH 4,0, percebe-se que o processo de imobilização não influenciou o comportamento da enzima, causando efeitos negativos em termos de estabilização, ou alterações na estrutura nativa da QM.

Figura 40- Estabilidade da enzima QM nos derivados coimobilizados, ao longo de 5h de incubação em diferentes valores de pH.



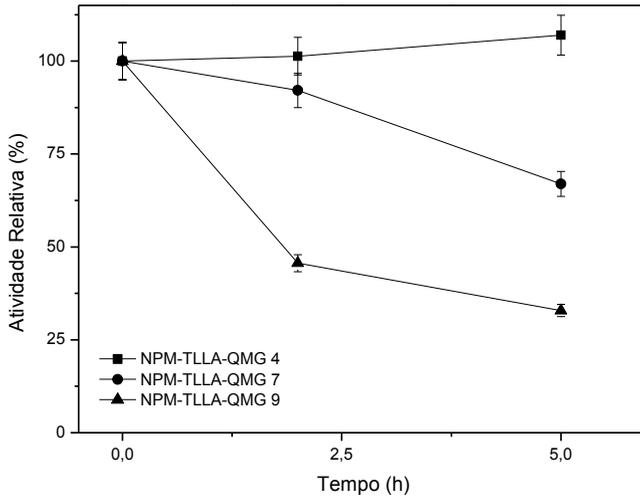
#### 6.4.6 Entrecruzamento do Derivado NPM-TLLA-QM com Glutaraldeído

O Entrecruzamento dos derivados coimobilizados demonstrou ser uma estratégia eficiente no aumento da estabilidade dos derivados, conforme apresentado no Capítulo V. Desta forma, o método que apresentou os melhores resultados no entrecruzamento do derivado NPM-TLL-βGal foi adotado, também, para a coimobilização da TLL e QM.

O derivado NPM-TLLA-QM foi estabilizado através do entrecruzamento utilizando com 0,5 % (v/v) de glutaraldeído durante 2 h de reação.

Durante a caracterização do derivado, houve a recuperação de 95,5 % de atividade para a QM e 100 % de atividade para a TLL, após 5 h de incubação a 70 °C. No entanto, a reticulação das proteínas causou modificações estruturais visíveis na QM em relação a sua estabilidade em pH básico, no qual a atividade recuperada da QM foi inferior a 50 % após 5 h de incubação, como mostra a Figura 41.

Figura 41- Estabilidade da enzima QM nos derivado coimobilizado entrecruzado com glutaraldeído 0,5%, ao longo de 5h de incubação em diferentes valores de pH



## 6.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A coimobilização da QM e TLL através dos mecanismos propostos ocorreu de forma satisfatória, conferindo à QM uma melhor estabilidade quando comparada com sua forma livre. Os efeitos positivos da imobilização foram mais evidentes em relação à termoestabilidade da QM, a qual se manteve estável em temperaturas de 50°C após a imobilização, ao passo que a enzima livre se manteve estável em 30°C. Para os derivados NPM-TLLA-QM e NPM-TLLA-QMG, foi verificada uma alta estabilidade acima de 60°C.

Embora a coimobilização tenha sido satisfatória, de uma forma geral, o derivado que apresentou um melhor comportamento foi o derivado NPM-TLLA-QM, obtido a partir da imobilização via adsorção no derivado aminado NPM-TLLA. Neste caso, tratamentos adicionais de entrecruzamento no derivado final não resultaram em melhorias no desempenho operacional do biocatalisador.

A modificação do derivado NPM-TLLA com dextrano-aldeído 1,5 kDa resultou em um derivado altamente estável termicamente, sem afetar a estrutura das proteínas envolvidas. As etapas de ativação com glutaraldeído resultaram em efeitos positivos somente em concentração de até 10 %, sendo que acima deste valor foram observados efeitos

## *Capítulo VI*

negativos em relação à estabilidade operacional da TLL, resultando na inativação térmica desta proteína.

## 7. CONCLUSÕES

As nanopartículas de magnetita modificadas com oxalato de sódio e lauril sulfato de sintetizadas apresentaram características desejáveis para sua aplicação como suporte enzimático, com um tamanho de partículas bastante reduzido, cerca de  $5,5 \pm 0,3\text{nm}$ , propriedades superparamagnéticas e uma boa estabilidade em solução.

A eficiência da aplicação das nanopartículas na imobilização de enzimas foi confirmada através dos resultados obtidos através das metodologias estudadas, permitindo a imobilização da lipase TLL através de mecanismos de adsorção; a coimobilização da TLL e  $\beta\text{Gal}$  envolvendo mecanismos de adsorção e entrecruzamento de ligações; e a coimobilização da TLL com a QM através de adsorção e entrecruzamento.

A superfície da NPM-SDS fortemente negativa possibilitou a obtenção de derivados enzimáticos imobilizados reversivelmente, mas com uma elevada força de ligação. Além do mais, foi observado a hiperativação da lipase mediante a presença de NaCl.

O entrecruzamento dos derivados coimobilizados utilizando agentes de reticulação como o glutaraldeído e o dextrano-aldeído proporcionou uma maior estabilidade operacional aos derivados enzimáticos. No entanto, a concentração de glutaraldeído utilizado no processo mostrou-se um fator importante, uma vez que elevadas concentrações podem resultar em uma menor atividade recuperada do derivado final.

Estes resultados, sobretudo, demonstram a versatilidade do suporte sintetizado, podendo ser aplicado de diversas maneiras, conforme as características da enzima selecionada, bem como do objetivo ao qual se destina o derivado final.

Os métodos de coimobilização desenvolvidos foram considerados eficientes em relação à imobilização de duas enzimas, através da modificação química da lipase. Os derivados obtidos apresentaram excelente estabilidade operacional e, acima de tudo, obtidos através de metodologias de execução simples e relativamente de baixo custo.

Como contribuição principal deste trabalho, pode-se salientar que as metodologias de coimobilização propostas podem ser aplicadas não somente para suportes magnéticos, mas também de outras naturezas. Além do mais, a modificação da lipase permite a seleção de outras classes de enzima para a coimobilização, possibilitando novas configurações de biocatalisadores.



## 8. SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

A partir da realização desta pesquisa e dos resultados obtidos até então, surgiram novas possibilidades de investigação a fim de ampliar a compreensão sobre o tema, além de dar uma continuidade a este trabalho através de novos estudos. Assim sendo, podem-se destacar como perspectivas para trabalhos futuros:

- Otimizar as condições de síntese do suporte NPM-TLL através do estudo de diferentes concentrações de SDS utilizado na funcionalização da magnetita;
- Avaliar o efeito de outros tipos de surfactantes na substituição dos grupos oxalato presentes na magnetita;
- Estudar o efeito da adsorção máxima de proteínas ao suporte magnético, com auxílio experimental e de modelos tipo Langmuir;
- Aperfeiçoar as condições de entrecruzamento dos derivados enzimáticos bifuncionais a partir do estudo de tempo de reação e concentração ideal dos agentes de entrecruzamento;
- Aplicar os derivados coimobilizados como biocatalisador em reações de síntese;
- Verificar a possibilidade de reuso dos biocatalisadores em múltiplas reações de síntese;
- Aplicar as técnicas de coimobilização através da derivatização da lipase imobilizada utilizando nanopartículas magnéticas de natureza distinta, como por exemplo, com coberturas poliméricas.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, R.; SARDAR, M. Enzyme Immobilization: An Overview on Nanoparticles as Immobilization Matrix. **Biochemistry & Analytical Biochemistry**, v. 4, n. 2, 2015.

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.

ANSARI, S. A.; HUSAIN, Q. Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: A review. **Biotechnology advances**, v. 30, n. 3, p. 512–23, 2012.

ANTONY, N.; SHERINE, H. B.; RAJENDRAN, S. Inhibition and biocide actions of sodium dodecyl sulfate-Zn<sup>2+</sup> system for the corrosion of carbon steel in chloride solution. **Portugaliae Electrochimica Acta**, v. 28, n. 1, p. 1–14, 2010.

AUGUSTUS, G.; RIBEIRO, P. As Propriedades Magneticas da Materia : um Primeiro Contato. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, 2000.

BALCÃO, V. M.; VILA, M. M. D. C. Structural and functional stabilization of protein entities: state-of-the-art. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 93, p. 25–41, 12 out. 2015.

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

BARBOSA, O. et al. Glutaraldehyde in bio-catalysts design: a useful crosslinker and a versatile tool in enzyme immobilization. **RSC Advances**, v. 4, n. 207890, p. 1583, 2014.

BARRETT, E. P.; JOYNER, L. G.; HALENDA, P. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **Journal of the**

**American Chemical Society**, v. 73, n. 1, p. 373–380, 1951.

BAYRAMOGLU, G.; TUNALI, Y.; ARICA, M. Y. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic poly(GMA-MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. **Catalysis Communications**, v. 8, n. 7, p. 1094–1101, 2007.

BETANCOR, L. et al. Glutaraldehyde in Protein Immobilization: A Versatile Reagent. In: GUIBAN, J. M. (Ed.). . **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. Totowa, New Jersey, United States: Humana Press, 2006a. p. 57–64.

BETANCOR, L. et al. Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 4, p. 877–882, 2006b.

BETANCOR, L.; LUCKARIFT, H. Co-immobilized coupled enzyme systems in biotechnology. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, v. 27, n. May 2013, p. 95–114, 2010.

BOLIVAR, J. M. et al. The presence of thiolated compounds allows the immobilization of enzymes on glyoxyl agarose at mild pH values: New strategies of stabilization by multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 477–483, dez. 2009.

BOLIVAR, J. M. et al. Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports. **Process Biochemistry**, v. 45, n. 10, p. 1692–1698, out. 2010.

BORK, J. A. et al. **Síntese e imobilização da lipase de *Rhizomucor miehei* em nanopartículas magnéticas modificadas com moléculas de lauril sulfato**. Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. **Anais...**São Paulo: Editora Edgard Blücher, fev. 2015

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

BRENA, B.; GONZÁLEZ-POMBO, P.; BATISTA-VIERA, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. In: GUIBAN, M. J. (Ed.). . **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p. 15–31.

BRUCE, I. J. et al. Synthesis, characterisation and application of silica-

magnetite nanocomposites. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 284, n. 1–3, p. 145–160, dez. 2004.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309–319, fev. 1938.

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.

BUKHARI, A. et al. Covalent immobilization of *Candida antarctica* lipase B on nanopolystyrene and its application to microwave-assisted esterification. **Chinese Journal of Catalysis**, v. 35, n. 9, p. 1555–1564, 2014.

CAMINO FELTES, M. M. et al. An Overview of Enzyme-Catalyzed Reactions and Alternative Feedstock for Biodiesel Production. In: **Alternative Fuel**. [s.l.] InTech, 2011.

CAMPONESCHI, E. et al. Surfactant Effects on the Particle Size and Formation of Iron Oxides via a Sol—Gel Process. In: [s.l.: s.n.]. p. 124–138.

CAO, M. et al. Food related applications of magnetic iron oxide nanoparticles: Enzyme immobilization, protein purification, and food analysis. **Trends in Food Science & Technology**, v. 27, n. 1, p. 47–56, set. 2012.

CARVALHO, N. B.; LIMA, Á. S.; SOARES, C. M. F. Uso De Sílicas Modificadas Para Imobilização De Lipases. **Química Nova Nova**, v. 38, n. 3, p. 399–409, 2015.

CASTILHO, L. R.; DECKWER, W.-D.; ANSPACH, F. B. Influence of matrix activation and polymer coating on the purification of human IgG with protein A affinity membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 172, n. 1, p. 269–277, 2000.

CASTRO, V. F. et al. Propriedades magnéticas e biocompatíveis de nanocompósitos para utilização em magneto-hipertermia. **Revista Brasileira de Física Médica**, v. 4, n. 1, p. 79–82, 2010.

CHALKIAS, N. **Immobilization of Enzymes on Inorganic Nanoparticles**. [s.l.] Cornell University, 2007.

CHANG, J. H. et al. Hydrophobic partitioning approach to efficient

protein separation with magnetic nanoparticles. **Analytical biochemistry**, v. 405, n. 1, p. 135–7, 1 out. 2010.

CHEN, S.-C.; DUAN, K.-J. Production of Galactooligosaccharides Using  $\beta$ -Galactosidase Immobilized on Chitosan-Coated Magnetic Nanoparticles with Tris(hydroxymethyl)phosphine as an Optional Coupling Agent. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 6, p. 12499–12512, 2015.

CHIARADIA, V. et al. Simultaneous single-step immobilization of *Candida antarctica* lipase B and incorporation of magnetic nanoparticles on poly(urea-urethane) nanoparticles by interfacial miniemulsion polymerization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 131, p. 31–35, 2016.

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

CIPOLATTI, E. P. et al. Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 99, p. 56–67, 2014.

CIPOLATTI, E. P. et al. Synthesis and modification of polyurethane for immobilization of *Thermomyces lanuginosus* (TLL) lipase for ethanolysis of fish oil in solvent free system. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 122, n. September 2016, p. 163–169, 2015.

CRUZ-IZQUIERDO, Á. et al. Magnetic Cross-Linked Enzyme Aggregates (mCLEAs) of *Candida antarctica* lipase: an efficient and stable biocatalyst for biodiesel synthesis. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115202, 2014.

CZAPINSKA, H.; OTLEWSKI, J. Structural and energetic determinants of the S1-site specificity in serine proteases. **European Journal of Biochemistry**, v. 260, n. 3, p. 571–595, 1999.

DANIELLE CRISTINA NEVES DA SILVEIRA PESSÔA REIS. **Importância do estudo da área superficial específica e porosidade do estearato de magnésio para o setor farmacêutico**. [s.l.: s.n.].

DICOSIMO, R. et al. Industrial use of immobilized enzymes. **Chemical Society Reviews**, v. 42, n. 15, p. 6437, 2013.

DISHLYUK, L.; NOVOSELOVA, M.; ROZALYONOK, T.

- Immobilization of Chymotrypsin on magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanoparticles. **Foods and Raw Materials**, v. 1, n. 2, p. 85–88, 2013.
- DRBOHLAVOVA, J. et al. Preparation and properties of various magnetic nanoparticles. **Sensors**, v. 9, n. 4, p. 2352–62, jan. 2009.
- ELNASHAR, M. The art of immobilization using biopolymers, biomaterials and nanobiotechnology. **Biotechnology of Biopolymers**, p. 3–33, 2011.
- ERDEMOGLU, M.; SARIKAYA, M. Effects of heavy metals and oxalate on the zeta potential of magnetite. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 300, n. 2, p. 795–804, 2006.
- FACIN, B. R. et al. Immobilization and controlled release of β-galactosidase from chitosan-grafted hydrogels. **Food Chemistry**, v. 179, p. 44–51, 2015.
- FAGUNDES, F. P. **Estudo da imobilização de proteases para a síntese de oligopeptídeos**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2011.
- 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.
- FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 45, n. 6–7, p. 405–418, dez. 2009.
- FERNANDEZ-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-LAFUENTE, R. et al. Stabilization of multimeric enzymes via immobilization and post-immobilization techniques. **Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic**, v. 7, n. 1–4, p. 181–189, 1999.
- FERNANDEZ-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.
- FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Effect of the immobilization

protocol in the activity, stability, and enantioselectivity of Lecitase Ultra. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 47, n. 3–4, p. 99–104, 2007.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Solid-Phase Chemical Amination of a Lipase from *Bacillus thermocatenulatus* to Improve its Stabilization via Covalent Immobilization on Highly Activated Glyoxyl-Agarose. **Biomacromolecules**, v. 9, p. 2553–2561, 2008a.

FERNANDEZ-LORENTE, G. et al. Interfacially activated lipases against hydrophobic supports: Effect of the support nature on the biocatalytic properties. **Process Biochemistry**, v. 43, n. 10, p. 1061–1067, 2008b.

FERREIRA, C. F. D. G. **Efeito da Aplicação do Campo Elétrico na Formação de Filmes Protéicos de GlnB-Hs Sobre Substratos Sólidos**. [s.l.] UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2012.

FUENTES, M. et al. Determination of protein-protein interactions through aldehyde-dextran intermolecular cross-linking. **Proteomics**, v. 4, n. 9, p. 2602–2607, 2004.

GAIHRE, B. et al. Gelatin-coated magnetic iron oxide nanoparticles as carrier system: drug loading and in vitro drug release study. **International journal of pharmaceutics**, v. 365, n. 1–2, p. 180–9, 5 jan. 2009.

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.

GÜRDAŞ, S.; GÜLEÇ, H. A.; MUTLU, M. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -Galactosidase onto Duolite A568 Resin via Simple Adsorption Mechanism. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 3, p. 904–911, 2012.

HAMES, B. . **Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach**. **Oxford University Press**, p. 373, 1998.

HARJU, M.; KALLIOINEN, H.; TOSSAVAINEN, O. Lactose hydrolysis and other conversions in dairy products : Technological aspects. **International Dairy Journal**, v. 22, n. 2, p. 104–109, 2012.

HERTZLER, S. et al. Nutrient Considerations in Lactose Intolerance. **Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease**, p. 757–772,

2013.

HOARE, D. G.; OLSON, A; KOSHLAND, D. E. The reaction of hydroxamic acids with water-soluble carbodiimides. A Lossen rearrangement. **Journal of the American Chemical Society**, v. 90, n. 6, p. 1638–1643, 1968.

HOMAEI, A. A. et al. **Enzyme immobilization: An update** **Journal of Chemical Biology**, 2013.

HONG, J. et al. Conjugation of  $\alpha$ -chymotrypsin on a polymeric hydrophilic nanolayer covering magnetic nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 42, n. 3–4, p. 99–105, 2006.

HONG, J. et al. Stability and activity of chymotrypsin immobilized on magnetic nanogels covered with carboxyl groups. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 111, n. 6, p. 2844–2850, 2009.

HORST, M. F.; LASSALLE, V.; FERREIRA, M. L. Nanosized magnetite in low cost materials for remediation of water polluted with toxic metals, azo- and anthraquinonic dyes. **Frontiers of Environmental Science and Engineering**, v. 9, n. 5, p. 746–769, 2015.

HUSAIN, Q. et al. Immobilization of *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase on zinc oxide nanoparticles via simple adsorption mechanism. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 49, n. 1, p. 37–43, 2011.

JESIONOWSKI, T.; ZDARTA, J.; KRAJEWSKA, B. Enzyme immobilization by adsorption: A review. **Adsorption**, v. 20, n. 5–6, p. 801–821, 2014.

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.

JU, H.-Y. et al. Optimal covalent immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 9–15, 2012.

KAMAL AHMADI, M.; VOSSOUGH, M. Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin on the surface of magnetic/gold core/shell nanoparticles. **Journal of Nanotechnology**, 2013.

KHOUBI, M. et al. Polyethyleneimine-modified superparamagnetic

- Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for lipase immobilization: Characterization and application. **Materials Chemistry and Physics**, v. 149, p. 77–86, 2015.
- KLEIN, M. P. et al. High stability of immobilized β-d-galactosidase for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides synthesis. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 465–470, 2013.
- KUMAR, A.; VENKATESU, P. Overview of the stability of α-chymotrypsin in different solvent media. **Chemical Reviews**, v. 112, n. 7, p. 4283–4307, 2012.
- KUMARI, S. et al. Bio-waste derived dialdehyde cellulose ethers as supports for α-chymotrypsin immobilization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 85, p. 227–237, 2016.
- LADERO, M. et al. Activity over lactose and ONPG of a genetically engineered β-galactosidase from *Escherichia coli* in solution and immobilized: Kinetic modelling. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 29, n. 2–3, p. 181–193, 2001.
- LAURENT, S. et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chemical reviews**, v. 108, n. 6, p. 2064–110, jun. 2008.
- LEE, D.-G. et al. Immobilization of lipase on hydrophobic nano-sized magnetite particles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 57, n. 1–4, p. 62–66, 2009.
- LEI, L. et al. Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 4, p. 252–258, 2009.
- LI, G. et al. Preparation and properties of magnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-chitosan nanoparticles. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 466, n. 1–2, p. 451–456, 2008.
- LIESE, A.; HILTERHAUS, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, 2013.
- LIU, H. et al. Covalent immobilization of *Kluyveromyces fragilis* β-galactosidase on magnetic nanosized epoxy support for synthesis of galacto-oligosaccharide. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 35, n. 8, p. 1287–1295, 2012.
- 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.

LIU, X. et al. Preparation of carriers based on magnetic nanoparticles grafted polymer and immobilization for lipase. **Biochemical Engineering Journal**, v. 56, n. 3, p. 142–149, 2011.

LOPEZ-GALLEGO, F. et al. Enzyme stabilization by glutaraldehyde crosslinking of adsorbed proteins on aminated supports. **Journal of Biotechnology**, v. 119, n. 1, p. 70–75, 2005.

LÓPEZ-GALLEGO, F. et al. Improved stabilization of chemically aminated enzymes via multipoint covalent attachment on glyoxyl supports. **Journal of biotechnology**, v. 116, n. 1, p. 1–10, 2005.

LU, S.; RAMOS, J.; FORCADA, J. Self-stabilized magnetic polymeric composite nanoparticles by emulsifier-free miniemulsion polymerization. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 23, n. 26, p. 12893–900, 2007.

LUKOVI, N.; KNEŽEVI, Z.; BEZBRADICA, D. Biodiesel Fuel Production by Enzymatic Transesterification of Oils : Recent Trends , Challenges and Future Perspectives. **Alternative Fuel**, p. 47–65, 2011.

MAMANI, J. B.; GAMARRA, L. F.; DE SOUZA BRITO, G. E. Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles with perspectives in biomedical applications. **Materials Research**, v. 17, n. 3, p. 542–549, 2014.

MARCIELLO, M. et al. Useful oriented immobilization of antibodies on chimeric magnetic particles: Direct correlation of biomacromolecule orientation with biological activity by AFM studies. **Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids**, v. 30, n. 49, p. 15022–15030, 2014.

MARÍN-NAVARRO, J. et al. Immobilization of thermostable  $\beta$ -galactosidase on epoxy support and its use for lactose hydrolysis and galactooligosaccharides biosynthesis. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, n. 3, p. 989–998, 2014.

MARTINS, A. R.; BURKERT, C. A. V. Revisão: Galactooligosacarídeos (GOS) e seus efeitos prebióticos e bifidogênicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 3, p. 230–240, 2009.

MASUDA, H. et al. Basic Properties and Measuring Methods of Nanoparticles. In: **Nanoparticle Technology Handbook**. [s.l: s.n.]. p.

3–48.

MATEO, C. et al. Increase in conformational stability of enzymes immobilized on epoxy-activated supports by favoring additional multipoint covalent attachment. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 26, n. 7, p. 509–515, 2000.

MATEO, C. et al. Very Strong But Reversible Immobilization of Enzymes on Supports Coated With Ionic Polymers. In: GUIBAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. Totowa, New Jersey, United States: Humana Press, 2006a. p. 205–216.

MATEO, C. et al. Stabilization of Multimeric Enzymes via Immobilization and Further Cross-Linking With Aldehyde-Dextran. In: GUIBAN, J. M. (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. 2. ed. Totowa, New Jersey, United States: Humana Press, 2006b. p. 129–141.

MATEO, C. et al. Glyoxyl agarose: A fully inert and hydrophilic support for immobilization and high stabilization of proteins. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 274–280, 2006c.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 6, p. 1451–1463, 2007.

MAURICIO, M. R. et al. Synthesis of highly hydrophilic magnetic nanoparticles of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> for potential use in biologic systems. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 417, p. 224–229, 2013.

MENDES, A. A. **Seleção de suportes e protocolos de imobilização de lipases para a síntese enzimática de biodiesel**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2009.

MENDES, A.; OLIVEIRA, P. DE. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Quim. Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MORENO-PÉREZ, S.; GUIBAN, J. M.; FERNANDEZ-LORENTE, G. Selective ethanolysis of fish oil catalyzed by immobilized lipases. **JAACS**, v. 91, p. 63–69, 2014.

MOTEVALIZADEH, S. F. et al. Lipase immobilization onto polyethylenimine coated magnetic nanoparticles assisted by divalent metal chelated ions. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 120, p. 75–83, 2015.

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

NAKKHARAT, P. et al. Formation of galacto-oligosaccharides during lactose hydrolysis by a novel  $\beta$ -galactosidase from the moderately thermophilic fungus *Talaromyces thermophilus*. **Biotechnology Journal**, v. 1, n. 6, p. 633–638, 2006.

NASCIMENTO, M. G.; et al. Imobilização de enzimas e materiais poliméricos: aplicações sintéticas em meio orgânico. Biocatálise e Biotransformação: Fundamentos e Aplicações. São Paulo: Schoba. v. 2, p.45-83, 2012.

NERI, D. F. M. et al. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* onto a polysiloxane – polyvinyl alcohol magnetic (mPOS – PVA ) composite for lactose hydrolysis. **Catalysis Communications**, v. 9, p. 2334–2339, 2008.

NERI, D. F. M. et al. Enzymatic Immobilized -galactosidase onto magnetic particles coated with polyaniline : Support characterization and galactooligosaccharides production. **Journal of Molecular Catalysis. B, Enzymatic**, v. 70, n. 1–2, p. 74–80, 2011.

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

NICOLETTI, G. et al. Evaluation of different methods for immobilization of *Candida antarctica* lipase B (CalB lipase) in polyurethane foam and its application in the production of geranyl propionate. **Bioprocess and biosystems engineering**, v. 38, n. 9, p. 1739–48, 2015.

PAN, C. et al. Novel and efficient method for immobilization and stabilization of  $\beta$ -D-galactosidase by covalent attachment onto magnetic  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -chitosan nanoparticles. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 61, n. 3–4, p. 208–215, 2009.

PANESAR, P. S. et al. Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 81, n. 4, p. 530–543, 2006.

PANESAR, P. S.; KUMARI, S.; PANESAR, R. Potential Applications

of Immobilized  $\beta$ -Galactosidase in Food Processing Industries. **Enzyme research**, v. 2010, p. 473137, 2010.

PAULY, M.; KEEGSTRA, K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. **The Plant journal : for cell and molecular biology**, v. 54, n. 4, p. 559–68, 2008.

PEDROCHE, J. et al. Effect of the support and experimental conditions in the intensity of the multipoint covalent attachment of proteins on glyoxyl-agarose supports: Correlation between enzyme–support linkages and thermal stability. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 5, p. 1160–1166, 2007.

PEIRCE, S. et al. Development of simple protocols to solve the problems of enzyme coimmobilization. Application to coimmobilize a lipase and a  $\beta$ -galactosidase. **RSC Advances**, v. 6, n. 66, p. 61707–61715, 2016.

PENZOL, G. et al. Use of dextrans as long and hydrophilic spacer arms to improve the performance of immobilized proteins acting on macromolecules. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 60, n. 4, p. 518–523, 1998.

PESSELA, B. C. C. et al. The immobilization of a thermophilic  $\beta$ -galactosidase on Sepabeads supports decreases product inhibition: Complete hydrolysis of lactose in dairy products. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 33, n. 2–3, p. 199–205, 2003.

PESSELA, B. C. C. et al. Stabilization of a Multimeric  $\beta$ -Galactosidase from *Thermus sp.* strain T2 by Immobilization on Novel Heterofunctional Epoxy Supports Plus Aldehyde-Dextran Cross-Linking. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 1, p. 388–392, 2004.

PESSELA, B. C. C. et al. Modulation of the catalytic properties of multimeric  $\beta$ -galactosidase from *E. coli* by using different immobilization protocols. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 40, n. 2, p. 310–315, 2007.

PIZARRO, C. et al. Influence of different immobilization techniques for *Candida cylindracea* lipase on its stability and fish oil hydrolysis. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 78, p. 111–118, 2012.

POHLMAN, A. R.; GUTERRES, S. S. Forum de Competitividade em Nanotecnologia Contribuições GT Marco Regulatório. 2010.

PONVEL, K. M. et al. Immobilization of lipase on surface modified magnetic nanoparticles using alkyl benzenesulfonate. **Korean J. Chem. Eng.**, v. 26, n. 1, p. 127–130, 2009.

PURI, M.; BARROW, C. J.; VERMA, M. L. Enzyme immobilization on nanomaterials for biofuel production. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 4, p. 215–216, 2013.

QUILLES JUNIOR, J. C. **Imobilização de lipases por adsorção e ligação covalente em derivados de agarose e quitosana e a aplicação em biocatálise.** [s.l.] Universidade Estadual Paulista “Julio Mesquita Filho”, 2014.

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.

REETZ, M. T. et al. Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: Magnetic separation of heterogeneous biocatalysts. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 134, n. 1–3, p. 251–258, 1998.

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.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization-stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 963–968, 2009a.

RODRIGUES, R. C. et al. Immobilization–stabilization of the lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Critical role of chemical amination. **Process Biochemistry**, v. 44, n. 9, p. 963–968, 2009b.

RODRIGUES, R. C. et al. Improved reactivation of immobilized-stabilized lipase from *Thermomyces lanuginosus* by its coating with highly hydrophilic polymers. **Journal of Biotechnology**, v. 144, n. 2, p. 113–119, 2009c.

SANTIAGO, P. A. et al. Estudo da produção de  $\beta$ -galactosidase por fermentação de soro de queijo com *Kluyveromyces marxianus*. **Ciência**

e **Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 4, p. 567–572, 2004.

SCHETTINO JR., M. ÂNGELO. **Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro.** [s.l.] Universidade Federal de Vitória, 2009.

SCHUABB, V.; WINTER, R.; CZESLIK, C. Improved activity of  $\alpha$ -chymotrypsin on silica particles – A high-pressure stopped-flow study. **Biophysical Chemistry**, v. 218, p. 1–6, 2016.

SHELDON, R. A. Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance. **Advanced Synthesis & Catalysis**, v. 349, n. 8–9, p. 1289–1307, 2007.

SHELDON, R. A.; VAN PELT, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. **Chemical Society reviews**, v. 42, n. 15, p. 6223–35, 2013.

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

SINNECKER, P. Materiais Magnéticos Doces e Materiais Ferromagnéticos Amorfos. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, v. 22, n. 3, p. 396–405, 2000.

SOJITRA, U. V.; NADAR, S. S.; RATHOD, V. K. A magnetic tri-enzyme nanobiocatalyst for fruit juice clarification. **Food Chemistry**, v. 213, p. 296–305, 2016.

SUI, Y. et al. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 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.

SUSTROVA, B. et al. Immobilization of  $\alpha$ -chymotrypsin to magnetic particles and their use for proteolytic cleavage of porcine pepsin A. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 60, n. 1–2, p. 22–28, 2009.

TEIXEIRA, V. G.; COUTINHO, F. M. B.; GOMES, A. S. Principais métodos de caracterização da porosidade de resinas à base de divinilbenzeno. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 808–818, 2001.

TEJA, A. S.; KOH, P.-Y. Synthesis, properties, and applications of magnetic iron oxide nanoparticles. **Progress in Crystal Growth and**

**Characterization of Materials**, v. 55, n. 1–2, p. 22–45, 2009.

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

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

TRAN, D.; CHEN, C.; CHANG, J. Immobilization of *Burkholderia sp.* lipase on a ferric silica nanocomposite for biodiesel production. **Journal of Biotechnology**, v. 158, n. 3, p. 112–119, 2012.

URRUTIA, P. et al. Improvement of chitosan derivatization for the immobilization of *Bacillus circulans*  $\beta$ -galactosidase and its further application in galacto-oligosaccharide synthesis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 41, p. 10126–10135, 2014.

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, 2000.

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

WILT, T. J. et al. Lactose intolerance and health. (Prepared by the Minnesota Evidence-based Practice Center under Contract No. HHSA 290-2007-10064-I.) AHRQ Publication No. 10-E004. **AHRQ Publication No. 10-E004. Rockville, MD. Agency for Healthcare Research and Quality**, n. 192, p. 1–410, 2010.

XIE, W.; ZANG, X. Immobilized lipase on core–shell structured  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ –MCM-41 nanocomposites as a magnetically recyclable biocatalyst for interesterification of soybean oil and lard. **Food Chemistry**, v. 194, p. 1283–1292, 2016.

XIN, B.; SI, S.; XING, G. Protease immobilization on gamma- $\text{Fe}_2\text{O}_3/\text{Fe}_3\text{O}_4$  magnetic nanoparticles for the synthesis of oligopeptides in organic solvents. **Chemistry, an Asian journal**, v. 5, n. 6, p. 1389–94, 2010.

XU, J. et al. Application of iron magnetic nanoparticles in protein immobilization. **Molecules**, v. 19, n. 8, p. 11465–11486, 2014.

- XUN, E. et al. Immobilization of *Pseudomonas fluorescens* lipase onto magnetic nanoparticles for resolution of 2-octanol. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 168, n. 3, p. 697–707, 2012.
- YADAV, R. P.; PATEL, A. K.; JAGANNADHAM, M. V. Purification and biochemical characterization of  $\alpha$ -chymotrypsin-like serine protease from *Euphorbia nerifolia* Linn. **Process Biochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1654–1662, 2011.
- YAN, F. et al. Preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/polystyrene composite particles from monolayer oleic acid modified Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles via miniemulsion polymerization. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 2, p. 289–296, 2008.
- YANG, K.; XU, N.-S.; SU, W. W. Co-immobilized enzymes in magnetic chitosan beads for improved hydrolysis of macromolecular substrates under a time-varying magnetic field. **Journal of biotechnology**, v. 148, n. 2–3, p. 119–27, 20 jul. 2010.
- YILMAZ, E.; SEZGIN, M.; YILMAZ, M. Immobilization of *Candida rugosa* lipase on magnetic sol–gel composite supports for enzymatic resolution of (R,S)-naproxen methyl ester. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 69, n. 1–2, p. 35–41, 2011.
- YOKOYAMA, T. et al. **Basic properties and measuring methods of nanoparticles**. [s.l.] Elsevier B.V., 2008.
- 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.
- ZDARTA, J. et al. Chitin-Lignin Material as a Novel Matrix for Enzyme Immobilization. **Marine Drugs**, v. 13, p. 2424–2446, 2015.
- ZHANG, S.; GAO, S.; GAO, G. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase onto magnetic beads. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 160, n. 5, p. 1386–1393, 2010.
- ZHOU, Q. Z. K.; DONG CHEN, X. Immobilization of  $\beta$ -galactosidase on graphite surface by glutaraldehyde. **Journal of Food Engineering**, v. 48, n. 1, p. 69–74, 2001.

# APÊNDICE I- ANÁLISE DO DIFRATOGRAMA DE RAIOS-X DA AMOSTRA NPM-SDS

2θ	I (mm)	I (%)	θ (graus)	θ (Rad)	d <sub>hkl</sub> (nm)	sen <sup>2</sup> (θ)	S <sub>cc</sub>	sen <sup>2</sup> (θ)/S <sub>cc</sub>	S <sub>cc</sub>	sen <sup>2</sup> (θ)/S <sub>cc</sub>	S <sub>cc</sub>	sen <sup>2</sup> (θ)/S <sub>cc</sub>	(hkl)	(h <sup>2</sup> +k <sup>2</sup> +l <sup>2</sup> ) <sup>1/2</sup>	a (nm)		
30,1072	818	65,80853	15,0536	0,262735	2,965857	0,0674556	1	0,0674558	2	0,033727902	3	0,022485268	111	1,732050808	5,137015		
35,692	1243	100	17,846	0,311471	2,513545	0,093918	2	0,04695875	4	0,023479375	4	0,023479375	200	2	5,02709		
42,9767	449	36,12228	21,48835	0,375042	2,102852	0,134185	3	0,04472817	6	0,022364085	8	0,016773064	220	2,828427125	5,947764		
53,3569	347	27,91633	26,67845	0,465627	1,715655	0,201586	4	0,05039642	8	0,025198212	11	0,018325972	311	3,31662479	5,690185		
57,2419	501	11,25188	28,62095	0,49953	1,608099	0,229453	5	0,045895066	10	0,022945332	12	0,01912111	222	3,464401615	5,570618		
62,9481	586	47,14401	31,47405	0,548926	1,475353	0,272601	6	0,04543355	12	0,022716775	16	0,017037581	400	4	5,901412		
DESIVIO														λ=1,5406			
INCORRETO							INCORRETO							CORRETO			
0,008712273							0,004336137							0,02574251		MEDIA=	5,545681
DESIVIO PADRÃO= 0,309085																	

Onde:  
 CS= estrutura cúbica simples  
 CCC= estrutura cúbica de corpo centrado  
 CFC= estrutura cúbica de face centrada  
 $S = h^2 + k^2 + l^2$

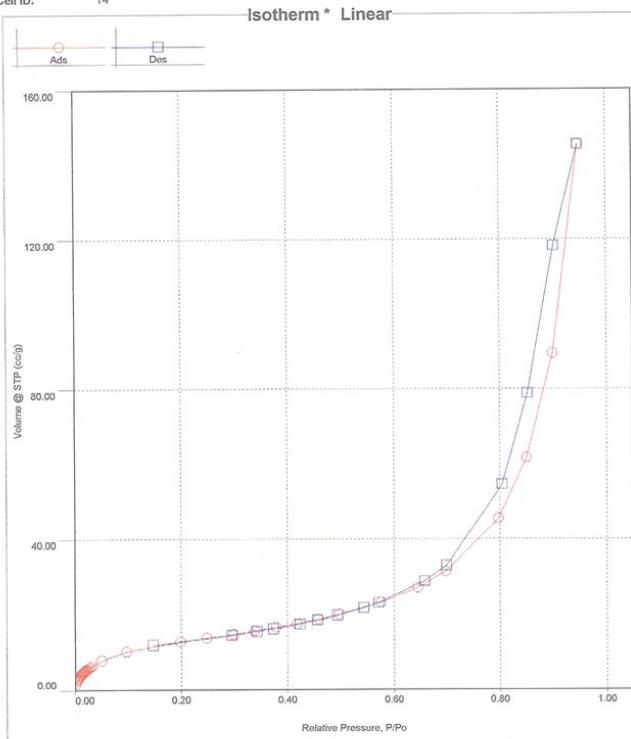


# ANEXO I - ISOTERMAS DE ADSORÇÃO/DESORÇÃO DE N<sub>2</sub> – MÉTODO BET E BJH

Quantachrome NovaWin - Data Acquisition and Reduction  
for NOVA instruments  
©1994-2007, Quantachrome Instruments  
version 10.01



<b>Analysis</b>	<b>Date:</b> 2014/05/07	<b>Report</b>	<b>Date:</b> 5/25/2016
Operator: Jasan	Filename:	Operator: Jasan	C:\QC\data\physisorb\2016\Tuca Malo 2016\Fe3O4_SDS.qps
Sample ID: Fe3O4_SDS	Comment:	Sample Volume: 0 cc	
Sample Desc: Fe3O4_SDS	Outgas Time: 24.0 hrs	Outgas Temp: 50.0 C	
Sample weight: 0.1094 g	Analysis gas: Nitrogen	Bath Temp: 77.3 K	
Outgas Time: 24.0 hrs	Press. Tolerance: 0.050/0.050 (ads/des)	Equil time: 180/180 sec (ads/des)	Equil timeout: 360/360 sec (ads/des)
Analysis Time: 470.9 min	Cell ID: 14	End of run: 2014/05/07 8:12:35	Instrument: Nova Station B



**Analysis**  
Operator: Jasan  
Sample ID: Fe3O4\_SDS

Date: 2014/05/07  
Filename:

**Report**  
Operator: Jasan  
Date: 5/25/2016  
C:\Q\data\physisorb\2016\Tuca\Maio 2016\FE3O4\_SDS.qps

**Volume/Area summary**

Surface Area Data

MultiPoint BET.....	3.660e+01 m <sup>2</sup> /g
Langmuir surface area.....	3.543e+01 m <sup>2</sup> /g
BJH method cumulative adsorption surface area.....	5.990e+01 m <sup>2</sup> /g
BJH method cumulative desorption surface area.....	6.999e+01 m <sup>2</sup> /g
DH method cumulative adsorption surface area.....	6.092e+01 m <sup>2</sup> /g
DH method cumulative desorption surface area.....	7.149e+01 m <sup>2</sup> /g
t-method micropore surface area.....	3.660e+01 m <sup>2</sup> /g
DR method micropore area.....	1.748e+02 m <sup>2</sup> /g

Pore Volume Data

Total pore volume for pores with Radius less than 193.07 Å at P/Po = 0.947649.....	2.249e-01 cc/g
BJH method cumulative adsorption pore volume.....	2.307e-01 cc/g
BJH method cumulative desorption pore volume.....	2.386e-01 cc/g
DH method cumulative adsorption pore volume.....	2.267e-01 cc/g
DH method cumulative desorption pore volume.....	2.330e-01 cc/g
DR method micropore volume.....	6.204e-02 cc/g
HK method cumulative pore volume.....	1.815e-02 cc/g
SF method cumulative pore volume.....	1.897e-02 cc/g

Pore Size Data

Average pore Radius.....	1.229e+02 Å
BJH method adsorption pore Radius (Mode Dv(r)).....	6.123e+01 Å
BJH method desorption pore Radius (Mode Dv(r)).....	6.289e+01 Å
DH method adsorption pore Radius (Mode Dv(r)).....	6.123e+01 Å
DH method desorption pore Radius (Mode Dv(r)).....	6.289e+01 Å
DR method micropore Half pore width.....	6.055e+01 Å
DA method pore Radius (Mode).....	1.740e+01 Å
HK method pore Radius (Mode).....	4.412e+00 Å
SF method pore Radius (Mode).....	7.982e+00 Å

**Total Pore Volume data**

Total Pore Volume

Total pore volume = 2.249e-01 cc/g for  
pores smaller than 193.1 Å (Radius)  
at P/Po = 0.94765

**Average PoreSize data**

Average pore Radius = 1.22882e+02 Å

Quantachrome NovaWin - Data Acquisition and Reduction  
for NOVA instruments  
©1994-2007, Quantachrome Instruments  
version 10.01



<b>Analysis</b>		<b>Report</b>	
Operator: Jasan	Date: 2014/05/07	Operator: Jasan	Date: 5/25/2016
Sample ID: Fe3O4_SDS	Filename:	C:\Q\data\physisorb\2016\Tuca\Malo 2016\Fe3O4_SDS.qps	

#### MBET summary

Slope =	93.996
Intercept =	1.143e+00
Correlation coefficient, r =	0.995254
C constant =	83.227
<b>Surface Area =</b>	<b>36.605 m<sup>2</sup>/g</b>

#### BJH adsorption summary

Surface Area =	59.797 m <sup>2</sup> /g
Pore Volume =	0.231 cc/g
Pore Radius Dv(r) =	61.231 Å

#### BJH desorption summary

Surface Area =	69.988 m <sup>2</sup> /g
Pore Volume =	0.237 cc/g
Pore Radius Dv(r) =	62.685 Å

#### DR summary

Slope =	-1.347e+00
Intercept =	5.484e-03
Correlation factor =	6.671e-01
Affinity coefficient (B) =	3.918e-01
Average Half pore width =	60.554 Å
Adsorption energy =	2.147 kJ/mol
Micropore volume =	0.062 cc/g
Micropore surface area =	174.580 m <sup>2</sup> /g

## ANEXO II - ARTIGOS CIENTÍFICOS E TRABALHOS PUBLICADOS DURANTE O PERÍODO DE DOUTORAMENTO

### 1 Capítulo em Livro:

276

*Mycology: Current and Future Developments, Vol. 1, 2016, 276-315*

#### CHAPTER 10

### Immobilization of Plant Cell Wall Degrading Enzymes

César Rafael Fanchini Terrasan<sup>1</sup>, Eliane Pereira Cipolatti<sup>2,3</sup>, Livia Tereza de Andrade Souza<sup>2,4</sup>, Rosana Oliveira Henriques<sup>2,3</sup>, Sonia Moreno-Pérez<sup>1,2</sup>, Wilson Galvão de Morais Junior<sup>2,5</sup>, Amadi Onyetugo Chioma<sup>6</sup>, José Manuel Guisan<sup>1</sup> and Benevides Costa Pessela<sup>2,7</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Biocatálisis Enzimática Instituto de Catálisis y Petroquímica, ICP Consejo Superior de Investigaciones Científicas-CSIC, Madrid-España;* <sup>2</sup>*Dpto. Biotecnología y Microbiología de Alimentos, Instituto de Investigación en Ciencias de los Alimentos, CIAL, Consejo Superior de Investigaciones Científicas - CSIC Cantoblanco, Campus UAM, 28049, Madrid-España;* <sup>3</sup>*Dpto. Chemical and Food Engineering, Federal University of Santa Catarina (UFSC), P.O. Box 476, 88040-900, Florianópolis- Brazil;* <sup>4</sup>*Institute of Biological Science Federal University of Minas Gerais, Pampulha, Box 486, 31270-901, Belo Horizonte- Brazil;* <sup>5</sup>*School of Chemical Engineering, Federal University of Uberlândia, J. Campus Santa Mônica - Bloco 1K, 35400-902, Uberlândia- Brazil and* <sup>6</sup>*Department of Microbiology, Faculty of Biological Sciences, University of Nigeria, Nigeria*

**Abstract:** In this chapter, we carried out an extensive revision focusing on recent trends on immobilization of microbial enzymes responsible for the degradation of plant cell wall components. We include studies on both individual and mixed enzyme immobilization techniques. Among the diverse techniques, the use of pre-existing supports (chemical or physical binding) and the immobilization without supports enzyme cross-linked aggregates (CLEAs) or crystals (CLECs) were the most promising ones. Nevertheless, the development of new supports with valuable characteristics for the immobilization of these enzymes is still an interesting research field. Furthermore, studies on application of the biocatalysts in a small scale process or in a reactor were also reviewed. In this regard, the lignin component of plant cell walls has been investigated as a support for enzyme immobilization.

**Keywords:** Biocatalysts, biochemical characteristics, cellulolytic enzymes, enzyme immobilization, enzyme stabilization, ligninolytic enzymes, xylanolytic enzymes.

## 2 Artigos em Revistas Especializadas:

### 2.1 Artigos Publicados

# RSC Advances

**REVIEW**[View Article Online](#)  
[View Journal](#) | [View Issue](#)CrossMark  
click for updatesCite this: *RSC Adv.*, 2016, 6, 104675

## Nanomaterials for biocatalyst immobilization – state of the art and future trends

Eliane P. Cicolatti,<sup>ab</sup> Alessandra Valério,<sup>a</sup> Rosana O. Henriques,<sup>a</sup> Denise E. Moritz,<sup>a</sup> Jorge L. Ninow,<sup>a</sup> Denise M. G. Freire,<sup>b</sup> Evelin A. Manoel,<sup>bc</sup> Roberto Fernandez-Lafuente<sup>\*cd</sup> and Débora de Oliveira<sup>\*a</sup>

Nanotechnology is an area that has been growing over the years, being possible nowadays to find numerous materials constructed at nanoscale. In addition, many applications have been attributed to these “new” materials. In this review is presented a brief overview of nanoparticles used for the immobilization of enzymes. Considering the extensive universe of immobilization in nanoparticles, some were chosen to be exposed here, such as chitosan, graphene, silica, polymers, magnetic, nanoflowers, among others. Advantages, disadvantages and limitations of nanoimmobilization also be discussed. Some applications of nanoimmobilized enzymes are presented, like as biodiesel, flavor synthesis ester and biosensors. The purpose of this paper is to provide an overview of what is being studied in relation to nanoparticles for enzymes immobilization, and some discussions about them, aimed at assisting researchers in future studies and reviews.

Received 2nd September 2016

Accepted 17th October 2016

DOI: 10.1039/c6ra22047a

[www.rsc.org/advances](http://www.rsc.org/advances)

## 2.2 Artigos Submetidos:

Elsevier Editorial System(tm) for Journal of  
Molecular Catalysis B: Enzymatic  
Manuscript Draft

Manuscript Number: MOLCAB-D-16-00430

Title: Magnetite nanoparticles synthesized by co-precipitation and functionalized with sodium dodecyl sulfate by ultrasound process: characterization and immobilization of *Candida antarctica* B lipase and application on monocaprylin synthesis

Article Type: Research Paper

Keywords: magnetite nanoparticles, lipase immobilization, enzymatic activity

Corresponding Author: Dr. Jonathan Alexander Bork,

Corresponding Author's Institution: University of South of Santa Catarina

First Author: Jonathan A Bork

Order of Authors: Jonathan A Bork; Rosana O Henriques; Eliane P Cipolatti; Bruno Niero; Gabriel M Weinsberger; Denise E Moritz; Agenor Furigo Jr.

Abstract: In this study lipase from *Candida antarctica* B was immobilized on the surface of sodium dodecyl sulfate (SDS) modified magnetite nanoparticles (MNP). The synthesis process of the MNP was done by co-precipitation, and after the surface was functionalized with SDS with an ultrasound bath. The infrared technique shows that the binding of the enzyme on the support was confirmed with the increase of peak intensity in 1410 cm<sup>-1</sup> region. SEM images show the trend of agglomeration of the particles before and after the process of immobilization. The TEM image analysis confirms the nanoscale from the support set with a range of particle size between 10-20 nm. DRX spectrometry results define the particles as magnetite with a crystalline structure without significant contaminants like hematite. The VSM analysis confirms the paramagnetic behavior of the synthesized nanoparticles comparing with pure paramagnetic magnetite properties. Following the immobilization process of CALB on NSM-SDS during 24 hours shows that the first hour almost all of the immobilized lipase was attached onto the support. Thermogravimetric analysis allows quantifying the amount of lipase adsorbed on the support and the thermal transitions of the magnetite according to the DTA peaks. The immobilization process enhance the hydrolytic activity of the lipase up to 26 %, however, the esterification activity was 62 % lower than the free lipase. The highest yields were obtained under conditions which glycerol was higher in molar ratio (ratio 6:1) with 41 % of conversion in monocaprylin.

## 3 Artigos completos em Anais de Eventos:



19 a 22 de outubro de 2014  
Florianópolis/SC

**SÍNTESE E IMOBILIZAÇÃO DA LIPASE DE *Rhizomucor miehei*  
EM NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS MODIFICADAS COM  
MOLÉCULAS DE LAURIL SULFATO**

J. A. BORK<sup>1</sup>, R. O. HENRIQUES<sup>1</sup>, G. M. N. WEINSBERGER<sup>1</sup>, A. FURIGO Jr.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos  
E-mail para contato: j.bork@ymail.com

RESUMO – Nanopartículas magnéticas são térmica, química e biologicamente estáveis para em aplicações in vivo, motivando pesquisas para aplicação como suporte enzimático, uma vez que o núcleo magnético facilita a remoção destas do meio reacional e seu reuso. O suporte foi sintetizado por precipitação em meio alcalino contendo oxalato, sendo a seguir reagido com lauril sulfato de sódio (LS). A lipase de *Rhizomucor miehei* dissolvida em NaCl aquoso foi agitada por 24 h e o acompanhamento da imobilização mostrou que 57 % foi imobilizada na primeira hora. A caracterização do suporte foi feita por espectrometria no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), mostrando redução dos picos do oxalato em 1390 e 1660  $\text{cm}^{-1}$  e o aparecimento de picos de LS na região de 2900  $\text{cm}^{-1}$ . A imobilização da lipase foi evidenciada pelos picos em 1650  $\text{cm}^{-1}$  atribuídos a ligações com proteínas. A atividade de esterificação foi medida com reação de ácido oleico e etanol usando 2 % de enzima resultando em 27,57  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$  de atividade.



## SÍNTESE E MODIFICAÇÃO DE POLIURETANO VIA MINIEMULSÃO PARA IMOBILIZAÇÃO de *Thermomyces lanuginosa* (TLL)

Eliane P. Cicolatti<sup>1,2</sup>, Sonia M. Pérez<sup>1</sup>, Livia T. de A. Souza<sup>1,3</sup>, Rosana O. Henriques<sup>1,2</sup>,  
 José M. Guisán<sup>4</sup>, Débora de Oliveira<sup>2</sup>, Jorge L. Ninow<sup>2</sup>, Benevides C. Pessela<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Investigación en Ciencias de la Alimentación, C/ Nicolás Cabrera, 9, Campus de Cantoblanco - 28049, Madrid, Espanha.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Bairro Trindade - 88040-900 Florianópolis/SC, Brasil.

<sup>3</sup>Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Pampulha, Box 486, Belo Horizonte, MG, 31270-901, Brasil.

<sup>4</sup>Departamento de Biotecnología, Instituto de Catálisis-CSIC, Campus UAM, Cantoblanco, 28049 Madrid, Espanha.

E-mail para contato: elianecicolatti@yahoo.com.br

### RESUMO

A imobilização de enzimas aparece como uma alternativa na aplicação de enzimas, permitindo que esta se torne mais estável às condições bruscas de pH e temperatura. Muitos métodos de imobilização tem sido propostos com este intuito. A síntese de partículas de poliuretano via miniemulsão, alia as vantagens desse polímero, que possui qualidade ambiental e custo-benefício favorável, com o processo de miniemulsão, que possibilita a síntese em uma única etapa, e também possibilidade de incorporação de outros compostos. Este trabalho tem como objetivo estudar a imobilização de *Thermomyces lanuginosa* (TLL) em suportes de poliuretano com polietilenoglicol (PEG). Para isto três PEGs foram utilizados, de 400, 4000 e 6000. As partículas foram sintetizadas utilizando diisocianato de isoforona (IPDI) e poli( $\epsilon$ -caprolactona) diol (PCL530). A fase aquosa foi composta por água destilada, surfactante (SDS) e PEG. As partículas obtidas foram capazes de imobilizar a enzima com porcentagem de imobilização de 100%, mas apenas as de 4000 e 6000 alcançaram atividade recuperada de 100%. O derivado PU-PEG6000 apresentou o menor  $K_m$ , se aproximando da enzima livre, e a maior  $V_{max}$  dentre os derivados (45,79 mmol/min/mL), e ainda foi capaz de manter 100% de atividade relativa após 10h de incubação a 40°C. Este método ainda está em estudos, mas apresenta-se promissor na área de biocatálise.

## 4 Demais Trabalhos em Congressos e Eventos:



**EVALUATION OF *Saccharomyces cerevisiae* CELLS IMMOBILIZED WITH CALCIUM ALGINATE IN THE PRESENCE OF MAGNETIC NANOPARTICLES**  
**ORTIZ, S.<sup>1</sup>; BORK, J. A.<sup>1</sup>; HENRIQUES, R. O.<sup>1</sup>; FURIGO Jr., A.<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Department of Chemical Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis-SC, Brazil, (e-mail: samaraeq@gmail.com, j.bork@ymail.com, rosanahrq@gmail.com, agenor@enq.ufsc.br)