

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCELLO HENRIQUE DA SILVA CAVALCANTI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (Fe_3O_4)
E SEU USO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE
THERMOMYCES LANUGINOSUS (TLL)**

ALFENAS/ MG

2020

MARCELLO HENRIQUE DA SILVA CAVALCANTI

**SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS (Fe₃O₄)
E SEU USO COMO SUPORTE PARA IMOBILIZAÇÃO DE LIPASE
*THERMOMYCES LANUGINOSUS (TLL)***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Físico-Química

Orientador: Dr. Luciano Sindra Virtuoso

Coorientador: Dr. José Maurício S.F. da Silva

ALFENAS/ MG

2020

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas

Cavalcanti, Marcello Henrique da Silva.
C376s Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) e seu uso como suporte para imobilização de lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) / Marcello Henrique da Silva Cavalcanti - Alfenas/MG, 2020.
86 f. : il. --
Orientador: Luciano Sindra Virtuoso.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Enzimas imobilizadas. 2. Nanopartículas de Magnetita. 3. *Thermomyces lanuginosus*. 4. Lipase / Enzimologia. 5. Adsorção.
I. Virtuoso, Luciano Sindra. II. Título.

CDD-541

MARCELLO HENRIQUE DA SILVA CAVALCANTI

“Síntese e Caracterização de Nanopartículas Magnéticas (Fe₃O₄) e seu uso como Suporte para Imobilização de Lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL)”

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Físico-Química.

Aprovado em: 27/02/2020

Prof. Dr. Luciano Sindra Virtuoso - UNIFAL

Assinatura:



Prof. Dr. Diogo Gontijo Borges - UNIFENAS

Assinatura:



Profa. Dra. Olga Luisa Tavano - UNIFAL

Assinatura:



MARCELLO HENRIQUE DA SILVA CAVALCANTI

A minha mãe Olívia Maria da Silva, ao meu pai Edvaldo José Junqueira Cavalcanti e aos meus irmãos Roseara Rodrigues, Rodrigo Rodrigues e Rodolfo Rodrigues pelo apoio incondicional.

A minha noiva Melissa Lúcia Melo pelo amor, paciência, incentivo e cumplicidade durante todos os momentos desse trabalho.

Aos professores Luciano Sindra Virtuoso e Elaine Bernadete Reis de Souza por me incentivarem a superar os desafios e alcançar novos conhecimentos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, por me permitir chegar a esse sonho e por guiar os meus passos.

À Universidade Federal de Alfenas, ao Programa de Pós Graduação em Química e ao Instituto de Química pela oportunidade e infraestrutura usada no desenvolvimento deste trabalho e por permitir a minha formação.

Ao suporte técnico fornecido por diversos professores, técnicos e laboratórios que permitiram a realização deste trabalho, dentro e fora de nossa universidade. Aos laboratórios: Laboratório de Análise de Toxicantes e Fármacos (LATF), na pessoa do professor Dr. Eduardo Costa de Figueiredo; Laboratório de Bioprocessos; Laboratório de Bioquímica; Laboratório de Sistemas de liberação de fármacos (LSLF), na pessoa da professora Dra. Gislaine Ribeiro Pereira; Laboratório de Nutrição Experimental, na pessoa da professora Dra. Olga Luisa Tavano; Laboratório de Microscopia de Força Atômica (LabAFM), na pessoa do professor Dr. Ihosvany Camps e a Central Analítica da Universidade de São Paulo, na pessoa do Dr. Alfredo Duarte.

Aos amigos do Grupo de Pesquisa em Química de Colóides por todos os momentos vivenciados de muita aprendizagem e companheirismo. Agradeço a cada um pela paciência, carinho e amizade. Em especial, agradeço a oportunidade de aprender com aqueles que acompanharam toda a minha trajetória dentro do grupo de pesquisa: Cristina; Cíntia, Poliana, Pedro.

A técnica Bernadete de L. Carvalho Meira por toda a paciência, pela ajuda na execução dos experimentos e pelas sábias palavras nos momentos de crise.

Aos colaboradores, professor Dr. Adriano Aguiar Mendes e o discente Levy Bueno Alves (Biotecnologia) pela imensa contribuição ao trabalho.

Ao meu coorientador professor Dr. José Maurício S.F. da Silva pelo apoio e incentivo, e por ter me recebido inúmeras vezes para o desenvolvimento do trabalho.

Ao meu orientador, professor Dr. Luciano Sindra Virtuoso por acreditar que era possível mudar a vida de um simples aluno de ensino médio, trazendo-o para o seu grupo de pesquisa e proporcionando a ele experiências que jamais pensou que poderia alcançar. Hoje, depois de 8 anos juntos, esse aluno te agradece por todos os ensinamentos, paciência, dedicação e amizade, que o levaram a ser o profissional que ele se tornou, e que agora, pode ser chamado de mestre em química.

Ao apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES)
– Código de financiamento 001 e também a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de
Minas Gerais (FAPEMIG).

“Nem todos os dias são bons, mas existe algo de bom em cada dia”

- Autor desconhecido

“A mente que se abre a uma nova ideia nunca mais volta ao seu tamanho original””

- Albert Einstein

RESUMO

A imobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas é uma estratégia que viabiliza a recuperação do conjugado nanopartícula-enzima a partir da separação do material imobilizado por centrifugação ou pela aplicação de um campo magnético externo. Nesse contexto, o presente trabalho avaliou o uso de nanopartículas magnéticas (Fe_3O_4) como suporte para imobilização da lipase produzida por *Thermomyces lanuginosus* (TLL). Essa lipase possui importantes aplicações na indústria, como, por exemplo, na produção de biodiesel, pesticidas, alimentos, entre outros. De forma específica, na primeira etapa do trabalho, foram obtidas nanopartículas magnéticas (NPM) através do método de coprecipitação usando hidróxido de sódio como agente redutor. As NPM foram caracterizadas por TEM, AFM, DRX, FTIR, TGA, DLS e potencial zeta e os resultados mostraram por diferentes técnicas se tratar de NPM pequenas, devido as imagens de TEM apresentarem partículas de $8,3 \pm 2,7$ nm; de AFM apresentarem um tamanho de $12,0 \pm 2,0$ nm e os dados de DLS mostrarem um D_H $34,19 \pm 0,91$ nm, com superfície de carga variando entre + 35,0 mV em pH 3,0 à - 35,0 mV em pH 12,0. A caracterização por DRX comprovou que as NPM são do tipo Fe_3O_4 , por FTIR foi determinado a existência de ligações do tipo Fe-O e O-H no material e por TGA foi observado que as NPM são estáveis na faixa de temperatura de 400°C a 900°C.

Numa segunda etapa, a superfície de carga para a enzima TLL foi avaliada computacionalmente por meio das informações obtidas no PDB, sendo verificada a diferenciação do potencial eletrostático em cada região da macromolécula. Por fim, foram escolhidos 3 condições de controle de pH de forma a modificar as superfícies de carga da enzima e da NPM e avaliar o seu processo de adsorção. Assim, o material imobilizado apresentou 99,49% de adsorção da enzima ao suporte, recuperando 62,3% da atividade hidrolítica, em relação à atividade inicial da lipase livre. E a eficiência catalítica na síntese do éster oleato de etila foi de aproximadamente 80% após 12 ciclos de reutilização.

Palavras-chave: Imobilização de enzimas, Lipase *Thermomyces lanuginosus*, Nanopartículas magnéticas, Adsorção, Atividade hidrolítica.

ABSTRACT

The immobilization of enzymes in magnetic nanoparticles is a strategy that enables the recovery of conjugated nanoparticles enzymes from the selection of material immobilized by centrifugation or by the application of an external magnetic field. In this context, the present work used the magnetic nanoparticles (Fe_3O_4) as a support for immobilization of the lipase applied by *Thermomyces lanuginosus* (TLL). This lipase has important applications in the industry, such as, for example, in the production of biodiesel, pesticides, food, among others. Specifically, in the first stage of the work, it was magnetic nanoparticles (NPM) through the coprecipitation method using sodium hydrogen as a reducing agent. As the NPM were characterized by TEM, AFM, XRD, FTIR, TGA, DLS and potential zeta and results by different techniques used in the treatment of small NPM, for example, the TEM images showed displays of 8.3 ± 2.7 nm, the AFM showing a size of 12.0 ± 2.0 nm and the DLS showing a D_H 34.19 ± 0.91 nm, with a load surface varying between $+ 35.0$ mV at pH 3.0 to $- 35.0$ mV at pH 12.0. A characterization by XRD proven as NPM in the type Fe_3O_4 , by FTIR it was determined the display of captures of the type Fe-O and O-H in material and by TGA it was observed how NPM is the temperature range of 400°C to 900°C . In a second step, the charge surface for the TLL enzyme was computationally evaluated using the information obtained in the PDB, and the differentiation of the electrostatic potential in each region of the macromolecule was verified. Finally, 3 pH control conditions were chosen in order to modify the loading surfaces of the enzyme and NPM and evaluate its adsorption process. Thus, the immobilized material showed 99,49% of the enzyme adsorption to the support, recovering 62,3% of the hydrolytic activity, in relation to the initial activity of the free lipase. And the catalytic efficiency in the synthesis of the ethyl oleate ester was 80% after 12 cycles of reuse.

Keywords: Enzyme immobilization, *Thermomyces lanuginosus*, Magnetic nanoparticles, Adsorption, Hydrolytic activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	Célula unitária da estrutura cristalina do tipo espinélio	22
Figura 02 -	Diferentes tipos de comportamentos magnéticos em materiais	23
Figura 03 -	Processo de formação de uma ligação peptídica	24
Figura 04 -	Representação estrutural de uma proteína	26
Figura 05 -	Modelo de complementaridade estrutural entre enzima e substrato	27
Figura 06 -	Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação	33
Figura 07 -	Representação esquemática da interação iônica de uma molécula de enzima e seu suporte com diferentes cargas de superfície	35
Figura 08 -	Reação de hidrólise catalisada por lipase	37
Figura 09 -	Representação da modificação conformacional da lipase	38
Figura 10 -	Representação das conformações fechadas (em roxo) e aberta (em laranja) da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i>	39
Figura 11 -	Caracterização das nanopartículas magnéticas por TEM. Em (a), (b) e (c) micrografias das NPM em diferentes escalas; em (d) Histograma de distribuição apresentando o tamanho médio das NPM	53
Figura 12 -	Difratograma da síntese das nanopartículas magnéticas e seu respectivo padrão	54
Figura 13 -	Caracterização das nanopartículas magnéticas por diferentes técnicas. Em (a) curva de potencial zeta das NPM em função do pH; (b) Espectro da região do infravermelho da NPM sintetizada	55
Figura 14 -	Curva de potencial zeta da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> em função do pH	57
Figura 15 -	Potencial eletrostático da TLL em pH 4,0. Em (a) lado frontal ao sítio catalítico; em (b) lado oposto ao sítio catalítico. As manchas azuis representam as regiões positivas, as vermelhas, as regiões negativas e as manchas em verde representam as regiões hidrofóbicas	58

- Figura 16 - Potencial eletrostático da TLL em pH 4,0. Em (a) acessibilidade dos 59
resíduos localizados na TLL; em (b) contribuição energética de cada
aminoácido em com acessibilidade maior que 50% para o potencial
eletrostático da enzima. Azul para região positiva, vermelho para
negativa e verde para hidrofóbica
- Figura 17 - Potencial eletrostático da TLL em pH 8,0. Em (a) lado frontal ao 60
sítio catalítico; em (b) lado oposto ao sítio catalítico. As manchas
azuis representam as regiões positivas, as vermelhas, as regiões
negativas e as manchas em verde representam as regiões
hidrofóbicas
- Figura 18 - Potencial eletrostático da TLL em pH 8,0. Em (a) acessibilidade dos 61
resíduos localizados na TLL; em (b) contribuição energética de cada
aminoácido com acessibilidade maior que 50% para o potencial
eletrostático da enzima em pH 8,0. Azul para região positiva,
vermelho para negativa e verde para hidrofóbica
- Figura 19 - Comparação do potencial zeta em função do pH obtido para a lipase 62
Thermomyces lanuginosus e as nanopartículas magnéticas
- Figura 20 - Potencial eletrostático da TLL em pH 4,6. Em (a) lado frontal ao 65
sítio catalítico; em (b) lado oposto ao sítio catalítico. As manchas
azuis representam as regiões positivas, as vermelhas, as regiões
negativas e as manchas em verde representam as regiões
hidrofóbicas
- Figura 21 - Gráfico de Stern Volmer para a supressão da intensidade de 69
fluorescência da TLL em diferentes temperaturas na presença de
diferentes concentrações de NPM.
- Figura 22 - Dependência da constante de ligação (k_b) com a temperatura 70
- Figura 23 - Curvas termogravimétricas antes e depois da incorporação da 71
enzima TLL na superfície das NPM
- Figura 24 - Imagens topográficas bidimensional e tridimensional do AFM no 72
modo não contato das nanopartículas magnéticas (A); e do material
imobilizado (NPM@TLL) (B)
- Figura 25 - Estabilidade operacional do biocatalisador (NPM@TLL) após 73
sucessivos ciclos de síntese de oleato de decila

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Valores de pK e ponto isoelétrico dos aminoácidos	25
Tabela 2 -	Exemplos de publicações aplicando nanopartículas magnéticas para a imobilização de lipases	42
Tabela 3 -	Atividade enzimática das NPM@TLL produzidas em diferentes pHs	63
Tabela 4 -	Análise do teor de proteína no sobrenadante do processo de imobilização por diferentes métodos	67
Tabela 5 -	Valores dos parâmetros termodinâmicos associados a interação das NPM com a enzima TLL em diferentes temperaturas	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFM	Microscopia de Força Atômica
CSD	Cambridge Crystallographic Database
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz
D_H	Diâmetro Hidrodinâmico
DRX	Difração de raios X
FTIR	Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
ICDD	International Center for Diffraction Data
k_b	Constante de ligação
k_{sv}	Constante de Stern – Volmer
NPM	Nanopartículas Magnéticas de Fe_3O_4
NPM@TLL	Nanopartículas magnéticas recobertas com lipase TLL
PDB	Protein Data Bank
pI	Ponto isoelétrico
PZC	Ponto de carga zero
TEM	Microscopia eletrônica de Transmissão
TGA	Análise Termogravimétrica
TLL	Lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i>
ΔH°	Varição da entalpia padrão
ΔS°	Varição da entropia padrão
ΔG°	Varição da energia livre de Gibbs padrão

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Nanopartículas Magnéticas e suas propriedades	20
2.2	Enzimas e suas propriedades	24
2.3	Forças Intermoleculares envolvendo enzimas	28
2.3.1	<i>A importância da água em sistemas biológicos</i>	28
2.3.2	<i>Forças envolvidas na estabilização de proteínas</i>	29
2.4	Imobilização de Enzimas	32
2.4.1	<i>Adsorção Física, Química e Iônica</i>	33
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	Materiais	44
4.2	Síntese das Nanopartículas magnéticas	44
4.3	Imobilização da TLL nas nanopartículas magnéticas	45
4.4	Atividade Hidrolítica da TLL imobilizada nas NPM	46
4.5	Determinação do teor de enzima imobilizada	46
4.6	Estudo da dessorção das NPM@TLL nos diferentes pHs	47
4.7	Estudo da interação entre a enzima TLL e as NPM e seus parâmetros termodinâmicos	47
4.8	Determinação da eficiência catalítica das NPM@TLL	48
4.9	Técnicas de Caracterização	48
4.9.1	<i>Difração de raios X (DRX)</i>	49
4.9.2	<i>Potencial zeta (ζ)</i>	49
4.9.3	<i>Espalhamento dinâmico de luz (DLS)</i>	49
4.9.4	<i>Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)</i>	50
4.9.5	<i>Microscopia de Força Atômica (AFM)</i>	50
4.9.6	<i>Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)</i>	50
4.9.7	<i>Análise Termogravimétrica (TGA)</i>	50
4.9.8	<i>Mapeamento computacional do potencial eletrostático da TLL</i>	51
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52

5.1	Caracterização das nanopartículas magnéticas	52
5.2	Caracterização da lipase <i>Thermomyces lanuginosus</i> (TLL)	56
5.3	Caracterização do processo de imobilização das NPM@TLL	61
6	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS	75
	APÊNDICE A	84
	APÊNDICE B	85
	APÊNDICE C	86

1 INTRODUÇÃO

As demandas políticas e sociais por sistemas de produção sustentáveis e ecológicos, associados ao esgotamento das reservas de petróleo e uma sucessiva demanda mundial por matérias primas e energia, tornaram os processos biotecnológicos envolvendo enzimas, células vegetais ou animais e microorganismos estratégias importantes na aquisição de uma ampla gama de produtos usados na indústria química e petroquímica, farmacêutica, alimentícia, têxtil, de energia, entre outras (RAM, 2013).

Em particular, o advento da nanotecnologia e suas aplicações proporcionou a manipulação de materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem propriedades distintas, devido à sua escala nanométrica. A exploração dessas propriedades por meio do controle de suas estruturas em nível atômico/molecular viabilizou a criação de novos materiais mais econômicos e eficientes (MEDEIROS; MATTOSO, 2012). Da mesma forma, a nanotecnologia possui uma importante relação com a biologia molecular derivada da observação de que as operações fundamentais da biologia celular ocorrem em escala nano.

A união entre essas duas áreas proporcionou o surgimento da nanobiotecnologia, que tem grande relevância industrial devido à produção de novos materiais sintéticos ou parcialmente sintéticos inspirados nos organismos celulares. A possibilidade de integrar as propriedades biocatalíticas das enzimas com as propriedades eletrônicas, ópticas e magnéticas dos nanomateriais, propicia a modificação das estruturas e funções das enzimas e dos nanomateriais, proporcionando a formação de biocatalisadores com propriedades únicas.

Em contrapartida ao material macroscópico, a conjugação de nanomateriais e enzimas têm ajudado a revolucionar as aplicações industriais, principalmente no uso de enzimas imobilizadas. Na fabricação de biossensores, enzimas integradas a nanomateriais são usadas para melhorar o contato elétrico com a superfície de eletrodos. Na liberação intracelular, nanomateriais estão sendo utilizados como carreadores enzimáticos, para aumentar a permeabilidade e estabilidade de membranas, favorecendo o aumento do transporte de enzimas ativas para o interior de células vivas (LIN; CHEN; LIU, 2016). E por fim, vem sendo estudado o desenvolvimento de enzimas imobilizadas em nanomateriais para o uso como nanocatalisadores que apresentem alta estabilidade, fácil recuperação e reciclagem e que promova uma diminuição dos custos operacionais.

Neste sentido, o uso de catalisadores químicos tóxicos são um dos principais problemas a serem contornados, já que são os principais mediadores de reações usadas industrialmente e tem sido substituído por catalisadores biológicos (enzimas). O uso de enzimas permite uma alta seletividade no processo, além do uso de condições brandas, reduzindo a produção de reações secundárias indesejáveis. Portanto, a busca por catalisadores que incorporem uma elevada atividade, seletividade, reprodutibilidade, alto período de reuso, facilidade de recuperação e que minimizem os danos ao ambiente tem impulsionado as pesquisas atuais na área de nanobiotecnologia.

As enzimas mostram, por si só, uma série dessas vantagens apresentadas acima, contudo após atuarem como catalisadores em fase homogênea tornam-se impurezas que incorporam etapas de purificação nos processos. Apesar disso, a dificuldade na sua reutilização aumenta os custos operacionais. Nesse sentido, uma solução que tem sido estudada é o emprego de diferentes tipos de suportes sólidos para a imobilização enzimática. Esse procedimento possibilita o reuso do biocatalisador e favorece a estabilidade da enzima o que leva também à redução de custos no processo. Em especial, o uso de nanopartículas como suporte sólido confere ao biocatalisador um maior contato com a fase que contém o substrato e garantem um dos requisitos essenciais após a ação enzimática do biocatalisador, seja por aplicação de força G (centrifugação) e/ou aplicação de campo magnético, no caso de nanopartículas magnéticas. Neste último caso, o superparamagnetismo presente em nanopartículas formadas por óxido de ferro proporcionam a esses materiais grande facilidade de isolamento e separação de meios multifásicos complexos pela simples aplicação de um campo magnético externo, e sua fácil dispersão depois de cessada a aplicação do campo.

Dentre os diversos métodos de imobilização, o método por adsorção física tem sido considerado um dos mais simples e econômicos para a imobilização de enzimas. Além disso, a imobilização de uma enzima por adsorção física oferece uma faixa enorme de aplicabilidade em virtude de haver uma perturbação mínima na estrutura nativa da enzima (KUMAR et al., 2009).

Por outro lado, a literatura relata inúmeros problemas associados à estabilidade da enzima no suporte, que em virtude de diferentes condições do meio (pH), temperatura e força iônica, o processo de dessorção ocorre desordenadamente, provocando uma diminuição na eficiência catalítica do sistema (suporte-enzima), sendo necessário, portanto o uso de ligações mais fortes entre o suporte e a enzima, por exemplo: ligação covalente (ROLLETT et al., 2010).

Com o avanço das pesquisas em imobilização enzimática, a obtenção de enzimas nanoimobilizadas que reduzem os custos dos processos e o uso de co-produtos industriais vem sendo reportado em diversos trabalhos, como por exemplo, o uso de lipases imobilizadas no melhoramento de biorreatores, em síntese de ésteres e principalmente, na produção de biodiesel, em função da sua importância no processo de digestão e metabolismo de triglicérides, os hidrolisando em glicerol e ácidos graxos (CIPOLATTI et al., 2014).

A partir das leituras realizadas anteriormente e no decorrer do desenvolvimento desse trabalho, percebemos uma necessidade em discutir/ investigar os fundamentos que estão presentes nos processos de imobilização e que influenciam na eficiência dos biocatalisadores obtidos.

Nessa perspectiva, alguns questionamentos que promoveram a investigação descrita nesse trabalho foram: Por que a imobilização de enzimas em nanopartículas por adsorção física fornece baixas taxas de atividade recuperada? Quais os problemas enfrentados e como amenizá-los? Por que normalmente são utilizadas moléculas ligantes para modificar a superfície das nanopartículas e só depois realizar a imobilização da enzima? Será que não é possível imobilizar a enzima apenas a colocando em contato com as nanopartículas? Quais as condições que devem ser controladas para isso? Quais os tipos de ligações estão presentes nesses processos? Como a enzima está ligada a superfície? Quais os parâmetros e propriedades que governam as interações e como modificá-las para alcançar um biocatalisador fisicamente adsorvido e com alta eficiência?

Na tentativa de responder esses questionamentos, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a utilização de nanopartículas magnéticas como suporte para a imobilização da lipase TLL pelo método de adsorção física. De forma mais específica, objetivamos sintetizar e caracterizar por diversas técnicas nanopartículas magnéticas com controle de tamanho e forma; definir as melhores condições de imobilização da TLL nas NPM em função da maior diferença de carga superficial; determinar a atividade hidrolítica, o teor de proteína, a taxa de desorção e avaliar a separação e reuso do material imobilizado. Além disso, é pretendido caracterizar o material termodinamicamente.

Assim, as seções desse texto estão divididas inicialmente pela presente introdução, seguidas de uma fundamentação teórica com aspectos importantes relacionados ao trabalho, que proporcionam uma melhor compreensão dos resultados

obtidos. Em seguida, é apresentada uma revisão bibliográfica, no qual, são apresentados os avanços conquistados nos últimos 5 anos nos processos envolvendo a imobilização de lipases e, em especial, suas imobilizações em nanopartículas magnéticas e os desafios da área. Em continuação, são apresentadas as metodologias usadas e os resultados e discussões de forma ampla, numa tentativa de facilitar a compreensão da inovação do trabalho. Por fim, as conclusões e perspectivas do trabalho.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Nessa seção são apresentadas informações sobre as características e propriedades das nanopartículas, das enzimas e conceitos importantes para a compreensão dos resultados do trabalho.

2.1 Nanopartículas Magnéticas e suas propriedades

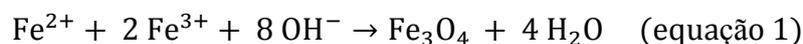
A nanotecnologia é uma ciência interdisciplinar que se dedica ao estudo da matéria em escala nanométrica, visando criar estruturas com novas propriedades e comportamentos que possam ser empregadas nas mais diversas áreas industriais. As nanopartículas apresentam propriedades distintas das moléculas em escala macroscópicas (bulk), devido ao efeito de tamanho e superfície que se tornam evidente em materiais que possuem tamanho entre 1 e 100 nm. Com a diminuição do tamanho médio da partícula, ocorre um aumento da área superficial por volume. Por exemplo, se a área superficial de um cubo com aresta de 1 cm é de 6 cm^2 para um volume de 1 cm^3 . Ao restringir a aresta do cubo para 1 mm, para um volume total de 1 cm^3 , é encontrado 1000 cubos cuja área superficial totaliza 60 cm^2 . Em escala nanométrica, admitindo que cada cubo seja composto por arestas de 1 nm, há 1021 cubos por 1 cm^3 de volume total, e a área superficial daí resultante é agora de $60.000.000 \text{ cm}^2$ (MARTINS; TRINDADE, 2012).

Nesse sentido, uma nanopartícula magnética com diâmetro de 30 nm, possui 5% dos seus átomos na superfície, enquanto que, a mesma nanopartícula com diâmetro de 10 nm possui 20% dos átomos na superfície e chegando a ter 50% dos átomos na superfície em diâmetros de 3 nm. Esse aumento de átomos na superfície das nanopartículas é responsável pelas diversas propriedades e empregabilidade desses materiais (MARTINS; TRINDADE, 2012).

As nanopartículas magnéticas são geralmente constituídas por óxidos de ferro, entretanto, nanopartículas obtidas a partir dos elementos níquel e cobalto, também possuem essa mesma nomenclatura. Na natureza existem diversos tipos de óxidos de ferro, sendo os principais: a ferrihidrita (Fe_5HO_8); a hematita ($\alpha \text{Fe}_2\text{O}_3$), a maguemita ($\gamma \text{Fe}_2\text{O}_3$); e a magnetita (Fe_3O_4). Essas espécies possuem propriedades magnéticas, elétricas, morfológicas e físico – químicas interessantes para a aplicação tecnológica. Contudo, somente a magnetita e em alguns processos a maguemita, possui momento

magnético suficientemente alto, baixa toxicidade, processo de obtenção economicamente viável e estabilidade química para ser aplicada em sistemas biológicos (FIGUEROLA et al., 2009).

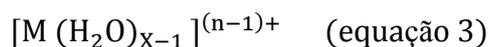
A magnetita é um óxido misto com fórmula molecular $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$, onde estão presentes na estrutura os cátions Fe^{2+} e Fe^{3+} numa proporção estequiométrica de 1: 2, podendo ser sintetizada através do método de coprecipitação de uma mistura de sais contendo Fe^{2+} e Fe^{3+} em ambiente aquoso seguido de precipitação com hidróxido e em atmosfera inerte, conforme a equação 1. Nesse método, pode ocorrer uma grande variação no tamanho. O controle de tamanho, forma e composição das partículas depende da razão estequiométrica entre os cátions, do pH, da velocidade de agitação do sistema e da velocidade de adição do agente redutor.



Na síntese da magnetita, primeiramente ocorre à coordenação das moléculas de água pelos cátions metálicos (M), formando espécies do tipo (equação 2):



as quais sofrem hidrólise e formam compostos do tipo (equação 3):

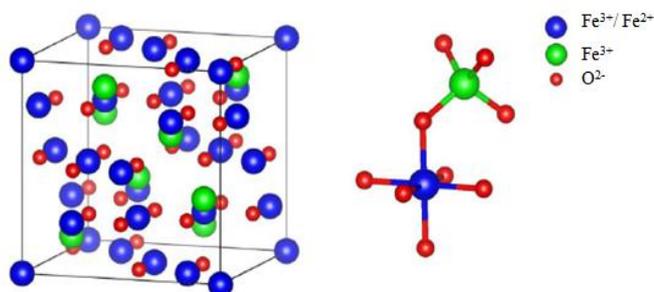


Esses compostos dimerizam com a liberação de água, obrigando os oxigênios dos grupos OH^- formarem ligações de hidrogênio entre os monômeros. Posteriormente, as espécies hidrolisadas continuam se associando e condensando-se através de ligações de hidrogênio em regiões ausentes de prótons, dando origem às características estruturais específicas da nanopartícula (SOUZA, 2011).

A magnetita forma uma estrutura do tipo espinélio invertido, AB_2O_4 , em que os íons O^{2-} formam um arranjo cúbico de face centrada, gerando dois tipos de sítios de coordenação, o primeiro tetraédrico, no qual, o cátion se encontra no centro do tetraedro interagindo com quatro íons oxigênio, e o segundo, octaédrico, onde uma proporção de cátions divalentes e trivalentes ocupam o centro do octaedro formado interações com seis íons oxigênio (figura 1) (SOUZA, 2011; VERWEY, 1939). Essa disposição resulta

em 24 átomos de Fe (16 íons Fe^{3+} e 8 íons Fe^{2+}) e 128 átomos de oxigênio arranjados em uma única célula unitária.

Figura 1 - Célula unitária da estrutura cristalina do tipo espinélio.



Fonte: BINI, 2016.

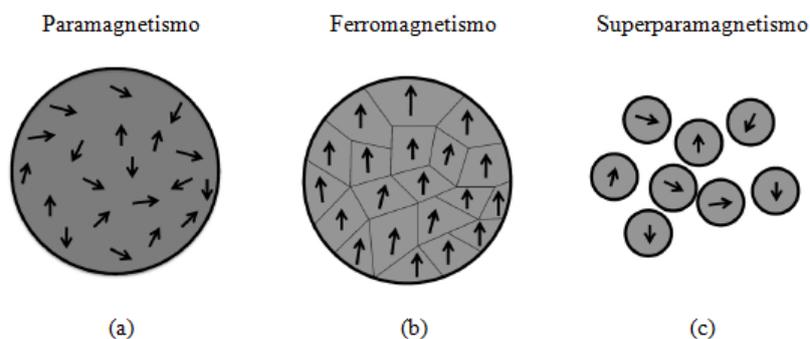
O átomo de Fe tem estrutura eletrônica $1s^2 2s^2 2p^6 3s^2 3p^6 4s^2 3d^6$ ou $[\text{Ar}]3d^6 4s^2$, enquanto que os íons Fe^{2+} tem $[\text{Ar}]3d^6$ e Fe^{3+} tem $[\text{Ar}]3d^5$. Essas configurações conferem ao íon Fe^{2+} 4 elétrons desemparelhados e ao íon Fe^{3+} 5 elétrons desemparelhados na configuração de alto spin. A disposição desses cátions nos diferentes sítios cristalográficos resultam em um arranjo de seus momentos magnéticos. Esse arranjo ocorre de maneira a formar subretículos com momentos magnéticos diferentes. Assim, o subretículo Fe^{3+} tetraédrico fica orientado antiparalelamente ao subretículo Fe^{3+} octaédrico. Como os dois subretículos são iguais, e os respectivos momentos magnéticos se cancelam, o momento magnético resultante é devido somente ao subretículo Fe^{2+} octaédrico (SOUZA, 2011; THAPA et al., 2004).

Os momentos magnéticos das nanopartículas magnéticas obtidas a partir da magnetita reagem ao efeito da aplicação de um campo magnético externo, podendo ser classificados em relação ao tipo de interação, atrativa ou repulsiva, quando esses formam um dipolo magnético. Um material diamagnético, como por exemplo, a água, não possui dipolo magnético quando exposto a um campo magnético externo devido a sua magnetização ocorrer em sentido oposto ao campo, resultando em uma força de repulsão. Já os materiais paramagnéticos apresentam dipolos magnéticos orientados aleatoriamente, podendo ser alinhados por ação de um campo magnético externo (figura 2a) e subdivididos em materiais ferromagnéticos; em materiais ferrimagnéticos; e em materiais antiferromagnéticos.

Em um material ferromagnético (figura 2b), os dipolos magnéticos existem mesmo na ausência de um campo magnético externo e exercem um efeito de longo

alcance, exibindo um momento magnético permanente. No material ferrimagnético existem sempre dipolos magnéticos mais fracos alinhados antiparalelamente com os dipolos magnéticos mais fortes adjacentes, na ausência de campo magnético externo. Exemplos de materiais ferrimagnéticos, são os óxidos de ferro: magnetita, Fe_3O_4 , maguemita, $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e as ferritas MFe_2O_3 em que $\text{M} = \text{Co}, \text{Ni}, \text{Mn}$, etc. Para um material antiferromagnético, os dipolos adjacentes são antiparalelos, na ausência de um campo externo, cancelando-se mutuamente. Os óxidos metálicos MnO , CoO e NiO são exemplos de materiais antiferromagnéticos. Em geral, os materiais apelidados trivialmente de magnéticos são aqueles que apresentam características de ferro ou ferrimagnetismo (JEONG et al., 2007; MARTINS; TRINDADE, 2012).

Figura 2- Diferentes tipos de comportamento magnético em materiais.



Fonte: Adaptado de MARTINS; TRINDADE, 2012.

Com a diminuição do tamanho de partícula abaixo de certo valor crítico, em um sólido ferromagnético, os elétrons desemparelhados se comunicam fortemente um com o outro e se alinham (mesmo com a ausência de um campo magnético) em regiões largas chamadas domínios magnéticos. Nessa situação, a formação de domínios torna-se energeticamente desfavorável e a redução de volume do material faz com que as nanopartículas magnéticas se comportem como um único átomo em um monodomínio (figura 2c) aumentando drasticamente o seu momento magnético. Este comportamento é chamado de superparamagnetismo e é a principal propriedade de interesse para aplicação desse tipo de material em processos de separação (MARTINS; TRINDADE, 2012).

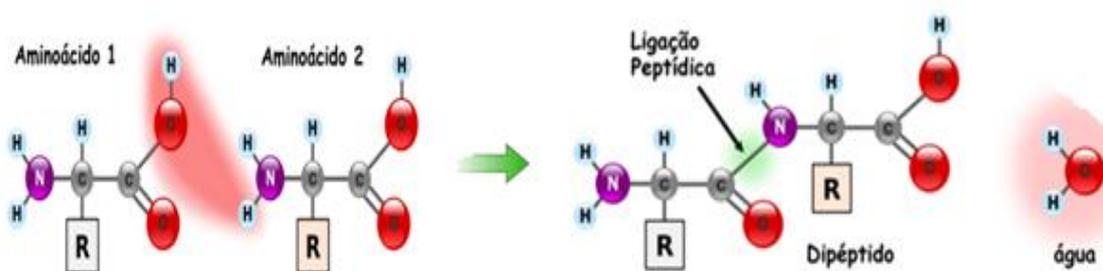
A estabilidade desses materiais está diretamente relacionada ao equilíbrio das interações atrativas e repulsivas entre as nanopartículas. As principais medidas usadas para garantir esse equilíbrio é o controle das cargas de superfície (repulsão eletrostática) e a utilização de moléculas de cadeias longas (repulsão estérica).

Na síntese de nanopartículas, os fenômenos de agregação e crescimento das partículas resultam na diminuição de sua área de superfície. Além disso, quando dispersas, apresentam movimento contínuo e aleatório que favorece sua agregação e precipitação. Esse movimento leva a um maior número de colisões entre partículas, o conteúdo energético se torna suficiente para promover a atração entre si, dando origem a partículas mais susceptíveis a força gravitacional, enfatizando o processo de agregação. Ao utilizar um recobrimento adequado, além de possibilitar um aumento na estabilidade coloidal, é possível conciliar a presença de grupos funcionais livres na superfície das nanopartículas (SILVA, 2017).

2.2 Enzimas e suas propriedades

Proteínas podem ser definidas como uma (ou mais) cadeia(s) polimérica(s) linear(es) formada(s) por resíduos de aminoácidos dispostos em ordem definida, que se unem por ligações peptídicas (figura 3). Dessa forma, são moléculas compostas por uma ou mais cadeias polipeptídicas, que adquirem estrutura tridimensional, responsável pelas suas atividades biológicas. A estrutura básica desses resíduos de aminoácidos é constituída de um carbono assimétrico (carbono α) com seus ligantes: um grupo carboxílico (-COOH), um grupo amino primário (-NH₂), um átomo de hidrogênio (-H), uma cadeia lateral (radical, R) variável entre os resíduos e são responsáveis, em conjunto, pelas características estruturais e funcionais das moléculas protéicas (CARRIJO; BARACAT - PEREIRA, 2014).

Figura 3- Processo de formação de uma ligação peptídica.



Fonte: <https://www.todoestudo.com.br/biologia/proteinas>. Acesso em: 06 ago. 2019.

O grupo lateral é diferente para cada aminoácido e define as características físico-químicas das moléculas, como a ionização em solução aquosa e o grau de polaridade. Os grupos funcionais de R reagem entre si ou com outros compostos protéicos, ou se

acomodam quimicamente em regiões polares (carregadas ou não), ou apolares das estruturas. Essas interações, predeterminadas em um contexto funcional, dão sustentação e estabilidade à estrutura nativa de uma proteína (CARRIJO; BARACAT - PEREIRA, 2014).

Assim, a carga elétrica total de uma proteína é dada pela somatória das cargas R dos aminoácidos, as quais dependem, por sua vez, dos valores de pKa e do pH do meio. A tabela 1, adaptada de Carrijo; Baracat-Pereira, 2014, mostra os valores de carga elétricas dos grupos que constituem os resíduos de aminoácidos.

Cada proteína é um polipeptídeo composto pelos 20 aminoácidos essenciais, que se diferenciam apenas pela ordem em que são sequenciados. Suas diversas combinações, em condições fisiológicas, propiciam um enovelamento espontâneo da biomolécula, formando uma estrutura tridimensional estável, designada de conformação nativa, que mantém a sua estabilidade e atividade biológica. A análise estrutural das proteínas é feita em quatro níveis diferentes.

Tabela 1- Valores de pK e ponto isoelétrico dos aminoácidos.

Aminoácidos	pK ₁	pK ₂	pK _R	pI	Aminoácidos	pK ₁	pK ₂	pK _R	pI
Gly	2,34	9,60		5,97	Arg	2,17	9,04	12,48	10,76
Ala	2,34	9,69		6,01	Asp	1,88	9,60	3,65	2,77
Val	2,32	9,62		5,97	Glu	2,19	9,67	4,25	3,22
Met	2,28	9,21		5,74	Asn	2,02	8,80		5,41
Pro	1,99	10,96		6,48	Gln	2,17	9,13		5,65
Leu	2,36	9,60		5,98	Ser	2,21	9,15		5,68
Ile	2,36	9,68		6,02	Thr	2,11	9,62		5,87
Phe	1,83	9,13		5,48	Trp	2,38	9,39		5,89
Lis	2,18	8,95	10,53	9,74	Cys	1,96	10,28	8,18	5,07
His	1,82	9,17	6,00	7,59	Tyr	2,20	9,11	10,07	5,66

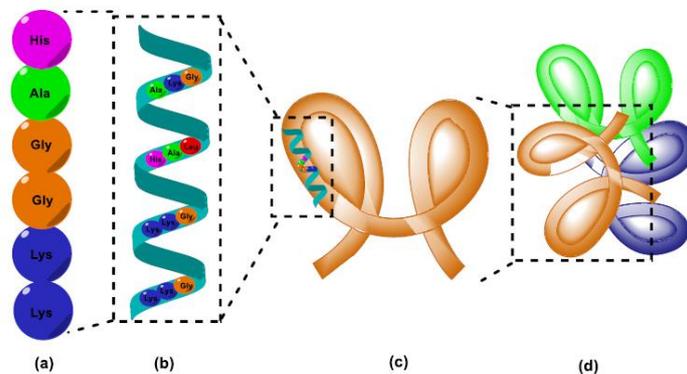
* pK₁ refere-se ao -COOH; pK₂ refere-se ao -NH₂; e pK_R refere-se ao radical

Fonte: CARRIJO; BARACAT - PEREIRA, 2014.

. A análise estrutural das proteínas é feita em quatro níveis diferentes. Na figura 4, a imagem (a) remete a estrutura primária de uma proteína, no qual, pré determina o número de conformações a partir da ordem dos aminoácidos; em (b) a maximização do número de pontes de hidrogênio leva à formação cooperativa de regiões de estrutura regular, chamadas de estrutura secundária; em (c) a associação de diferentes elementos da estrutura secundária resulta na formação de domínios estruturais determinados por propriedades quirais da cadeia polipeptídica e por empacotamentos que minimizem a área superficial da molécula, resultando na estrutura terciária; e em (d) o

empacotamento de várias subunidades protéicas com estruturas bem definidas originam a estrutura quaternária da proteína (TAIPA; GAMA, 2003).

Figura 4-Representação estrutural de uma proteína.

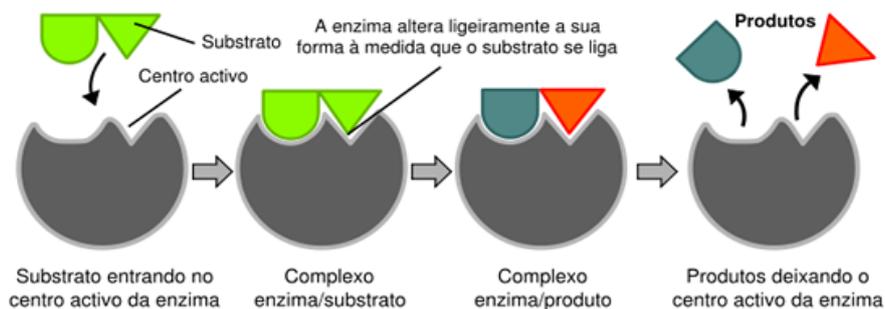


Fonte: DIAS, 2018.

Envolvidas em todos os processos naturais, as enzimas, uma classe especial de proteína, são catalisadores biológicos que aceleram as reações químicas em ambos os sentidos de um processo reversível sem se alterar. Nessa situação, as condições de reação se tornam mais suaves e energeticamente mais favoráveis, visto que, as enzimas atuam em condições de temperaturas abaixo de 100 °C, em valores de pH próximo a neutralidade e à pressão atmosférica. O entendimento da atuação desses biocatalisadores durante o processo de catálise foi estabelecido a partir do conceito de sítio ativo ou sítio catalítico, devido a sua especificidade em relação aos substratos que podem interagir. Este é definido como uma região tridimensional da enzima que permite a interação específica com o substrato e onde ocorre a reação química (SILVA, 2012).

A especificidade da ligação do substrato depende do arranjo dos átomos no centro catalítico que é descrito a partir do modelo de chave e fechadura, elaborado por E. Fischer em 1890 (figura 5). Esse modelo se baseia na especificidade da ação enzimática e pressupõe que o substrato e o centro catalítico terão formas complementares, existindo portanto, um encaixe perfeito. Contudo, outro modelo complementar, chamado de teoria do encaixe induzido foi desenvolvido por Koshland em 1958. Nessa concepção, os substratos ao interagir, provocam uma mudança conformacional no sítio catalítico e também podendo ocorrer no restante da estrutura da enzima (PEREIRA, 2010). E assim, a conversão dos reagentes em produtos numa reação enzimática é quantificada com base nesses modelos a partir da atividade enzimática apresentada pelo sistema.

Figura 5- Modelo de complementaridade estrutural entre enzima e substrato.



Fonte: <https://www.sobiologia.com.br>. Acesso em: 06 ago. 2019.

As enzimas são ativas em uma faixa estreita de pH e na maioria dos casos existe um pH ótimo, em que a sua atividade enzimática é máxima. Sua eficiência catalítica é influenciada pela ionização dos resíduos de aminoácidos presentes no sítio catalítico e depende de uma conformação tridimensional específica dessa mesma região. Esses grupos ionizáveis atuam normalmente como nucleófilos em reações enzimáticas, sendo que, uma pequena alteração de pH pode impedir esses grupos de permanecerem carregados, logo dificultando a formação do complexo enzima/substrato e consequentemente, impedindo que a reação catalítica aconteça. Portanto, quando é usado valores de pH próximo do ótimo é verificado uma diminuição na atividade enzimática, porém reversível, e quando são usados valores extremos, podem ocorrer perdas totais de atividade em decorrência do desnovelamento irreversível (desnaturação) da enzima (SILVA, 2012).

É importante ressaltar que nem todas as enzimas possuem o mesmo pH ótimo. Cada sistema controla seu grau de ionização através de uma solução tamponante. A partir disso, é importante a nível laboratorial que se inclua em qualquer ensaio um tampão para estabilizar as variações de carga possibilitando estudar o comportamento dessas moléculas durante uma reação de catálise.

Outra propriedade importante nesses processos é o controle da temperatura. O fornecimento de energia na forma de calor aumenta a probabilidade de colisão entre as moléculas promovendo um aumento de moléculas com energia de ativação suficiente para realização da reação química. Entretanto, esse efeito é contraditado pelo processo de desnaturação, que combinando esses dois efeitos dá origem a temperatura ótima da enzima. Assim, essa corresponde a temperatura máxima, na qual, a enzima possui

atividade catalítica máxima por um período de tempo determinado (CABRAL; GAMA; AIRES-BARROS, 2003).

E por fim, a estabilidade estrutural das enzimas é determinada por uma variedade de forças físicas, que resultam de interações, que ocorrem dependendo da disposição e orientação dos grupos funcionais da molécula. A conservação das ligações covalentes é indispensável para a manutenção da estrutura terciária de uma enzima. As forças de Van der Waals também são determinantes no que toca à estrutura das proteínas. E o elevado número de interações dipolo-dipolo, que embora apresentem uma energia associada relativamente baixa, apresenta um papel importante na estabilidade enzimática. No entanto, as interações eletrostáticas no geral contribuem pouco para a estabilidade, já que se encontram, na maioria das vezes, na superfície da molécula, em maior contato com o solvente. As ligações de hidrogênio intermoleculares são responsáveis pela estrutura tridimensional das enzimas, portanto contribuem para a sua estabilidade (SILVA, 2012).

2.3 Forças Intermoleculares envolvendo enzimas

Nessa subseção é discutida a contribuição e importância das forças intermoleculares no entendimento da interação e estabilização de macromoléculas

2.3.1 A importância da água em sistemas biológicos

A água é uma substância fundamental aos organismos vivos, constituindo de 50% a 70 % do meio celular, participando ativamente do processo biológico como solvente, mas também, influenciando a estrutura, a dinâmica, e as interações entre biomoléculas (BALL, 2008).

Em relação a sua estrutura química, a molécula de água é muito pequena, e a diferença de eletronegatividade entre os átomos de oxigênio e hidrogênio favorecem a deslocalização eletrônica de sua estrutura, criando regiões de distribuição de cargas. Em fase líquida, as características intrínsecas das moléculas de água as direcionam a formar arranjos tetraédricos. As interações dipolo–dipolo entre essas moléculas são de natureza eletrostática e recebem a denominação de ligações de hidrogênio. Essas ligações de hidrogênio tendem a ser cooperativas e em geral, podem se ligar a quatro outras moléculas de água próximas, levando a um acoplamento intermolecular extenso e um

movimento cooperativo de mais longo alcance (BONIFÁCIO, 2019; SHULTZ et al., 2011).

A nível molecular, a água participa da estabilização da estrutura nativa, da dobragem das três estruturas dimensionais e contribui com o ambiente térmico da proteína. O meio aquoso também influencia nas ligações peptídicas; nas interações proteína – ligante; proteína – biomoléculas; e na agregação de proteínas. Além disso, a água presente no sítio ativo das enzimas é importante para o reconhecimento, seletividade e dissociação do ligante, favorecendo as transições conformacionais obrigatórias para catálise e está diretamente relacionada aos processos químicos de reações de hidrólise, enantioseletividade e cinética enzimática (BIEDERMANNNOVA; SCHENEIDER, 2016).

2.3.2 Forças envolvidas na estabilização de proteínas

As interações moleculares são responsáveis pelas propriedades características de substâncias simples quanto à água, ou tão complexas quanto os polímeros (ATKINS; PAULA, 2008). A estrutura das proteínas é mantida por um conjunto de interações fracas entre grupos carbônicos e entre radicais dos resíduos de aminoácidos. Ocorrem tanto entre os aminoácidos constituintes da cadeia como também entre aminoácidos e moléculas de solvente no qual a proteína se encontra. Juntas, essas forças intra e intermoleculares garantem a estabilidade dinâmica das proteínas. A estabilidade dinâmica é assim denominada por garantir a manutenção da estrutura e também conferir versatilidade as proteínas e ser essencial para a sua funcionalidade. As interações relatadas que estão envolvidas na estabilização desses polímeros são as interações hidrofóbicas, eletrostáticas (ênfase nas ligações de hidrogênio), ligações covalentes entre outras. (CARRIJO; MARTINS, 2014).

Nas células vivas, os resíduos de aminoácidos são essenciais na formação dessas interações, garantindo a manutenção das estruturas nativas das proteínas, devido às propriedades físicas e químicas conferidas pelas diferentes cadeias laterais. Uma simples substituição de aminoácidos pode levar a mudanças nesse conjunto de forças e causar séria perturbação na estrutura das proteínas, podendo levar a perda de sua função (LESK, 2004).

Em meados de 1930, os estudos sobre proteínas estavam surgindo e as discussões sobre as forças que estabilizam essa estrutura ganharam destaque. Nessa época, Pauling

e Mirsk sugeriram que a ligação de hidrogênio entre o nitrogênio peptídico e átomos de oxigênio contribuía para a estabilização das proteínas. Após três anos, Bernal descreveu que os grupos hidrofóbicos interagem entre si e não se associam com o meio aquoso, formando uma força de associação repulsiva desses grupos com as moléculas de água que favorecem a estruturação das proteínas. Logo após, Kauzmann apresentou evidências que as ligações hidrofóbicas são um dos fatores mais importantes na estabilização e configuração nativa das proteínas. Já Kendrew sugeriu que, de longe, a contribuição mais importante vem das forças de Van der Waals entre os resíduos não polares que compõe a maior parte do interior das moléculas (PACE; SCHOLTZ; GRIMSLEY, 2014).

Assim, as estruturas protéicas dependem de uma diversidade de forças químicas para a preservação da estabilidade, como também para a especificidade de funcionamento e afinidade pelos seus ligantes, podendo classificar essas forças em: ligação de hidrogênio, interações hidrofóbicas, forças eletrostáticas e forças de Van der Waals.

As ligações de hidrogênio são formadas por átomos com elevada eletronegatividade em que o grupo doador de prótons possui uma densidade eletrônica deficiente em elétrons, enquanto que, o grupo aceitador de prótons possui um excesso de elétrons em sua configuração eletrônica. Essas interações são comumente classificadas a partir da sua magnitude energética de formação. As ligações com valores superiores a 15 Kcal.mol^{-1} são consideradas fortes, entre 15 Kcal.mol^{-1} e 4 Kcal.mol^{-1} moderadas ou normais e valores inferiores a 4 Kcal.mol^{-1} são definidas como ligações fracas.

As ligações de hidrogênio fortes formam moléculas de água quando prótons hidratados estão envolvidos e o comprimento dessa ligação (O-H), varia entre $1,22 - 1,34 \text{ \AA}$, e é comparável com o comprimento de ligações covalentes ($1,10 - 1,22 \text{ \AA}$). As ligações de hidrogênio moderada são formadas entre doadores de próton neutro e grupos aceitadores de prótons, sendo caracterizado por uma geometria com ângulos entre 180° e 140° , comprimento de ligação entre $1,70 \text{ \AA} - 2,00 \text{ \AA}$ e são freqüentes na estrutura de biomoléculas. Já nas ligações fracas ocorrem se o doador de prótons possui uma eletronegatividade inferior ao átomo de hidrogênio, sendo o deslocamento do núcleo de hidrogênio insignificante para a ligação, denominando as moléculas como apolares (KARSHIKOFF, 2006).

Em proteínas, as ligações de hidrogênio participam da estabilização da estrutura secundária a partir dos grupos NH_2^+ e COO^- e devido aos grupos peptídicos dos aminoácidos serem coplanares, esses são ligados por ligações de hidrogênio, limitando o número de conformações possíveis. Cada átomo de oxigênio no íon carboxilato pode formar até duas ligações de hidrogênio. Essas ligações entre resíduos de aminoácidos separados ao longo da estrutura secundária entre um grande número de unidades peptídicas formam uma rede de ligações de hidrogênio que mantêm a interação entre as subunidades na posição e orientação específica. As redes de ligação de hidrogênio também ocorrem em moléculas de água que competem para interagir com os grupos funcionais das cadeias laterais das proteínas (KARSHIKOFF, 2006).

As interações hidrofóbicas ocorrem quando compostos apolares sofre as consequências da ação dinâmica de moléculas polares, forçando esses grupos não polares a minimizar suas interações com o meio hidrofílico. No caso de proteínas presentes em meio aquoso, os resíduos hidrofóbicos se posicionam no interior da cadeia e os resíduos hidrofílicos são direcionados para a superfície e ficam disponíveis para interagir com moléculas de água. A agregação de cadeias laterais apolares no interior da proteína é favorecida pelo aumento da entropia das moléculas de água e a redução do efeito polar no interior da molécula pode ocorrer a partir de qualquer grupo carregado no interior da proteína que possa formar ligações de hidrogênio ou interações iônicas (CARRIJO; MARTINS, 2014).

As interações eletrostáticas ocorrem entre dois resíduos de aminoácidos, em que, um possui carga positiva e o outro carga negativa na cadeia lateral. Geralmente, possuem uma menor contribuição para a manutenção da estrutura protéica em relação às interações hidrofóbicas, devido à dependência de aminoácidos carregados e da distribuição espacial destes na estrutura tridimensional da proteína para formarem os pares iônicos e contribuir com a sua estabilização (CARRIJO; MARTINS, 2014; ROCHA, 2001).

Esse tipo de interação é dividida em iônica, no qual, ocorre entre cátions e ânions com forte diferença de cargas, podendo ter caráter atrativo ou repulsivo. Em interações dipolo – dipolo, em que, moléculas constituídas por átomos diferentes tendem a migrar seus elétrons para um átomo em detrimento da sua diferença de eletronegatividade (polarização), resultando em uma orientação espacial onde a nuvem eletrônica apresentará regiões com diferença de cargas. E em dipolo – dipolo induzido, que consiste na influência de um dipolo em polarizar uma segunda molécula que esteja

próxima (ROCHA, 2001). Assim, as interações eletrostáticas são importantes na estruturação das proteínas, pois regulam as propriedades dependentes do pH, tais como: atividade enzimática, desnaturação ácida ou alcalina, interações inibidoras, interações com substrato e muitas outras (KARSHIKOFF, 2006).

As interações de Van der Waals estão presentes sempre que duas moléculas se aproximam. É considerada atrativamente fraca, ocorrendo principalmente entre espécies neutras e apolares, entretanto, pode se pronunciar em estruturas polares ou carregadas, porém, seu efeito é minimizado pelas forças eletrostáticas. Quando compostos apolares interagem, uma molécula perturba a densidade eletrônica da outra ocasionando uma polarização dessas espécies favorecendo o surgimento de dipolos momentâneos, que podem ser vistos como uma interação dipolo induzido – dipolo induzido, que se orientam e originam essas interações fracas. Dessa forma, essas forças de dispersão são importantes na estabilização da estrutura protéica e a superfície da água, aumentando a sua força em função da diminuição da distância, até o momento em que as forças repulsivas superem as forças atrativas (ATKINS; PAULA, 2008; ROCHA, 2001).

2.4 Imobilização de Enzimas

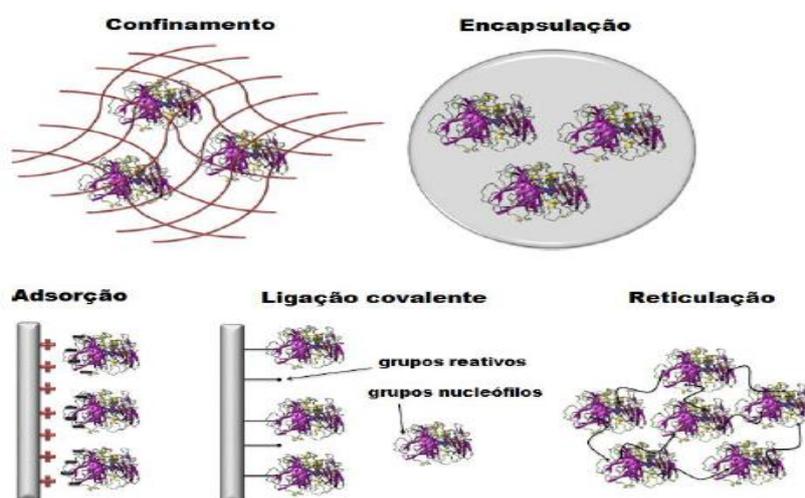
O processo de imobilização enzimática remete ao confinamento de enzimas em um suporte sólido que possa ser reutilizado, transformando o seu uso em uma estratégia mais econômica. Em geral, não há um método aplicável a todas as enzimas. Para cada tipo de aplicação, a escolha do material imobilizado requer a análise de uma série de fatores como: a utilização da atividade catalítica por um período maior de tempo, facilidade de separação do produto, facilidade na recuperação do biocatalisador, influência da temperatura e do pH, entre outros (GUISAN, 2006). Isso se deve as diferentes características físico-químicas de cada enzima, às diferentes propriedades dos substratos e produtos. Por isso, as condições ótimas de imobilização são empiricamente determinadas por tentativa e erro a fim de estabelecer a maior retenção da atividade enzimática, estabilidade operacional e durabilidade (KRAJEWSKA, 2004).

No momento em que uma enzima é imobilizada, algumas de suas propriedades físico – químicas podem ser alteradas. Devido as modificações ocasionadas pelas forças intermoleculares no microambiente, o pH ótimo das enzimas podem sofrer alterações; a constante de Michaelis – Menten, geralmente aumenta em razão da catálise heterogênea modificar a estrutura tridimensional e dificultar o processo de difusão; ocorre uma

maior estabilidade em razão do aumento da rigidez das ligações; e de forma geral, as enzimas imobilizadas apresentam menor vulnerabilidade à ação de ativadores e inibidores (BASILIO, 1994).

Dessa maneira, a imobilização de enzimas pode ser realizada por diferentes métodos, tais como: Confinamento em matrizes poliméricas, Encapsulação em membranas poliméricas, por adsorção física ou química (covalente) e por reticulação, conforme a figura 6.

Figura 6- Esquema dos métodos de imobilização de enzimas: confinamento, encapsulação, adsorção (via troca iônica), ligação covalente e reticulação.



Fonte: FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ; SANROMÁN; MOLDES, 2013.

2.4.1 Adsorção Física, Química e Iônica

Conforme a natureza das forças envolvidas, a adsorção pode ser classificada quanto a sua intensidade em: fisissorção (adsorção física) e quimissorção (adsorção química). No caso da adsorção física, a ligação da enzima à superfície do suporte é estabelecida por ligações fracas que podem ser atribuídas as forças de Van der Waals, que se assemelham as forças de coesão molecular. Já na adsorção química, as ligações são formadas a partir da troca ou compartilhamento de elétrons entre a enzima e a superfície do suporte, resultando em uma ligação química. Segundo a Termodinâmica, o calor de adsorção em uma ligação física está situado abaixo de 10 Kcal.mol^{-1} , na ordem de reações de condensação/vaporização, enquanto que, o calor de adsorção em uma ligação química é superior a ordem de 20 Kcal.mol^{-1} (VIDAL et al., 2014). Esses

processos promovem a adsorção das enzimas por fatores como: desidratação hidrofóbica, mudanças estruturais, interações eletrostáticas, interações de van der Waals e ligações específicas (MATEO et al., 2007; REIS et al., 2009).

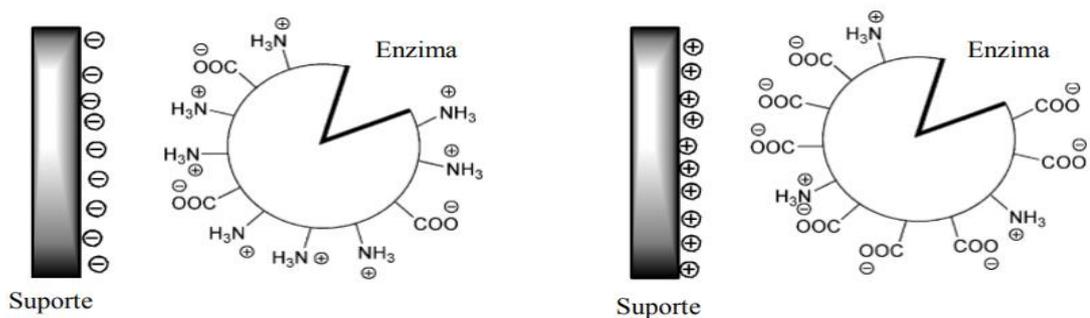
Contudo, os fenômenos de adsorção são condicionados pela natureza do suporte, da enzima e das condições operacionais. As características do suporte incluem: área superficial, tamanho, grupos funcionais presentes na superfície e hidrofobicidade do material. Em contra partida, a natureza da enzima depende da sua polaridade, do tamanho, da solubilidade e da acidez ou basicidade. Já as condições operacionais incluem, a temperatura, pH e a natureza do solvente (VIDAL et al., 2014). O aumento da temperatura afeta a constante de velocidade de adsorção, ocasionando um aumento da energia cinética e da taxa de difusão influenciando na capacidade de adsorção. (JIMENEZ; BOSCO; CARVALHO, 2004). Além disso, o pH também afeta a adsorção a partir da determinação do grau de distribuição das espécies químicas do suporte, tendenciando a superfície a se tornar positiva ou negativamente carregada (APPEL; MA; RHUEL, 2003).

Um caso particular no processo de imobilização por adsorção são as interações eletrostáticas atrativas, mais conhecidas como iônicas, que ocorrem entre cargas residuais de aminoácidos de enzimas e cargas opostas presentes no suporte (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). Por isso, as interações que auxiliam na imobilização são dependentes do pH reacional, do ponto isoelétrico da enzima e da distribuição de cargas na superfície do suporte. Por exemplo, as lipases possuem aminoácidos com grupos positivamente carregados em resíduos de lisina e arginina, e grupos negativamente carregados em resíduos de ácidos aspárticos e glutâmicos (TALBERT; GODDARD, 2012). Desse modo, o pH do meio define o potencial eletrostático da enzima, podendo beneficiar ou não a adsorção por ligações iônicas.

Quando o pH é igual ao ponto isoelétrico (pI) da proteína, o número de cargas positivas e negativas são iguais e a molécula de enzima passa a ter uma carga líquida neutra. Em condições abaixo do pI as proteínas são positivamente carregadas, enquanto em pH acima do pI as moléculas de enzima estão negativamente carregadas. Conseqüentemente, as interações eletrostáticas são favorecidas quando as repulsões na interface enzima – enzima e enzima – suporte são minimizadas, sendo que geralmente a capacidade máxima de adsorção é observada próximo ao pI da enzima (RABE; VERDES; SEEGER, 2011). A figura 7 mostra um esquema de interação iônica entre

uma molécula de enzima e seu suporte com diferentes distribuições de cargas na superfície.

Figura 7- Representação esquemática da interação iônica de uma molécula de enzima e seu suporte com diferentes distribuições de cargas na superfície.



Fonte: RABE; VERDES; SEEGER, 2011

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O primeiro relato de imobilização enzimática foi comunicado por Nelson e Griffin (1916), quando adsorveram a enzima invertase em carvão. Em 1940, é iniciada a aplicação de enzimas em processos industriais, entretanto, a escassa disponibilidade e alto custo dos biocatalisadores limitavam a sua utilização. Nesse contexto, a comunidade científica direcionou suas pesquisas para a construção de processos de produção de enzimas e métodos de imobilização para posterior reutilização. Assim, Grubhofer e Schleith (1953) imobilizaram amilase, pepsina e outras enzimas em poliacrilamida mostrando que elas mantinham a sua atividade. Posteriormente, em 1955, pesquisas foram direcionadas para a descoberta de polímeros que pudessem ser utilizados como suporte para imobilização de proteínas biologicamente ativas.

Em 1960, com a intensificação dos estudos de imobilização, Bar-Eli e Katchalski (1960) imobilizaram a enzima tripsina em anidrido de n- carboxi tirosina por adsorção e mostraram que esta mantinha 20% da sua atividade, em relação a forma livre da tripsina. Portanto, o método apresentava um aumento na estabilidade, favorecendo um período maior de estocagem do biocatalisador. Em 1968, algumas enzimas como a quimiotripsina, a papaína e a tripsina começaram a ser comercializadas em suportes poliméricos. Logo, ocorreram as duas primeiras aplicações industriais de enzimas imobilizadas: a isomerização de glicose em frutose por glicose isomerase (TAKASABI; KOSUGI; KANBAYASHI, 1969); e a resolução óptica de aminoácidos com aminoácidos acilase (CHIBATA; TOSA, 1976).

Em 1990, foi iniciado o uso da técnica de reticulação via reação com glutaraldeído por entrecruzamento de grupos aminos em estudos com cristais de termolisina para a produção de aspartame, e, subsequentemente foi demonstrado que o desenvolvimento desses métodos pode ser aplicado a diversas enzimas. Dessa forma, um grande número de novas metodologias de imobilização enzimática utilizando os mais variados tipos de suportes tem sido relatado na literatura, indicando a importância dessa linha de pesquisa (BASÍLIO, 1994; SOUZA et al., 2017).

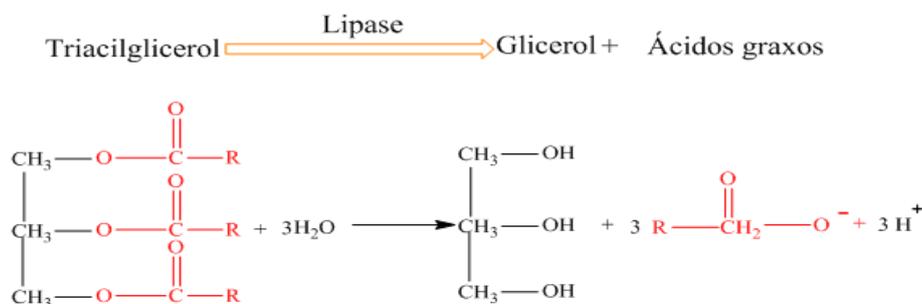
Atualmente cerca de 200 enzimas são comercializadas, desse total, aproximadamente 75% são enzimas hidrolíticas usadas em processos industriais. O mercado global de vendas de enzimas era de apenas alguns milhões de dólares por ano na década de 1960. Com o melhor entendimento dos processos de obtenção, os avanços nos métodos de uso e a crescente demanda da indústria por novos biocatalisadores, esse

mercado vem alcançando a cifras na ordem de US\$ 5,0 bilhões em 2015 e 2016, com crescimento estimado para US\$ 6,3 bilhões em 2021 (BCC RESEARCH, 2017; FERRAZ et al., 2018).

Dentre esse grande volume de vendas, as lipases se configuram como a terceira enzima mais vendida no mundo, ficando atrás apenas das proteases e amilases. A sua utilização na indústria de alimentos (aditivos para modificação de aromas), farmacêutica (medicamentos), química fina (síntese de ésteres), produção de detergentes (hidrólise de gorduras), tratamento de águas residuais (decomposição de substâncias oleaginosas) e, principalmente na produção de biodiesel vem alavancando o mercado de lipases, sendo gerado um valor aproximado de US\$ 590,5 milhões em 2020 (FERRAZ et al., 2018; MARKETS AND MARKETS, 2015; VESCOVI, 2016).

Lipases (glicerol éster hidrolases, E.C.3.1.1.3) compreendem um grupo de enzimas hidrolíticas que atuam na interface orgânica – aquosa, catalisando a hidrólise de óleos e gorduras com a liberação de ácidos graxos e glicerol (figura 8). Também participam da catálise de reações de esterificação, transesterificação e interesterificação (MIRANDA et al., 2014).

Figura 8- Reação de hidrólise catalisada por lipase.

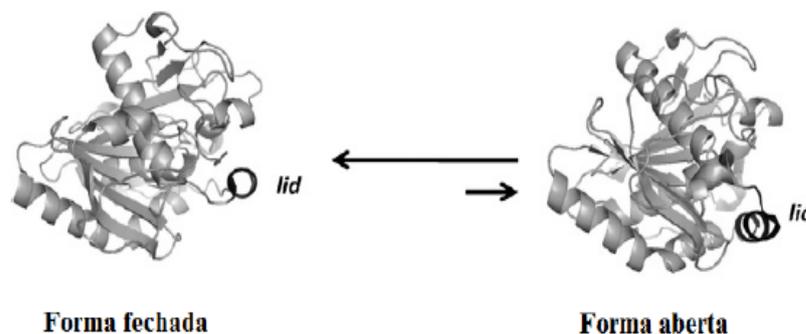


Fonte: Elaborado pelo autor.

O sítio ativo é formado por uma tríade catalítica que consiste dos aminoácidos SER – HIS – ASP, sendo essa tríade frequentemente protegida por uma tampa helicoidal hidrofóbica, chamada de “lid” (JAEGER; REETZ, 1998; VESCOVI, 2016). A interação da lipase com a interface lipídeo/água promove uma mudança conformacional na estrutura tridimensional da enzima movendo a tampa, convertendo a enzima de uma forma “fechada” para uma forma “aberta”, com o sítio ativo acessível ao substrato (figura 9). Com a abertura da tampa, uma grande superfície hidrofóbica é

exposta, facilitando a ligação da lipase ao substrato (DALLA – VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004; VESCOVI, 2016).

Figura 9 - Representação da modificação conformacional da lipase.



Fonte: FERNANDEZ – LAFUENTE, 2010.

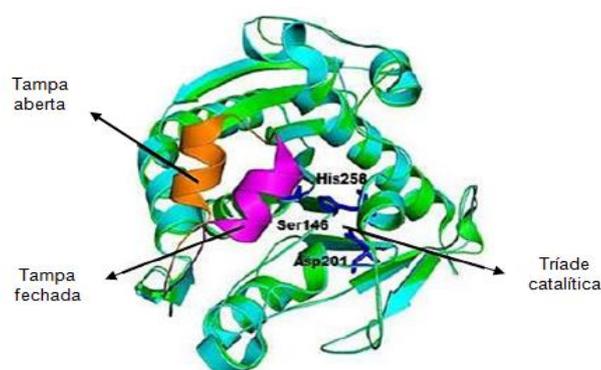
Enzimas lipolíticas são encontradas na natureza em tecidos de animais e vegetais, e podem ser obtidos por fermentação usando vários tipos de microorganismos (DALLA – VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Nos animais, as lipases participam dos processos de digestão de gordura; absorção; reconstituição e metabolismo de lipoproteínas (SHARMA; CHRISTI; CHAND, 2001). Nos vegetais, são encontradas em tecidos de reserva de energia, atuam nos primeiros estágios de germinação, iniciando a metabolização de triglicerídeos estocados por meio de hidrólise dos ácidos graxos (QUETTIER; EASTMOD, 2009). No entanto, a obtenção dessa enzima por fontes microbiana vem ganhando uma maior atenção comercial, devido ao seu menor custo de produção, estabilidade, maior quantidade de produto gerado e alta especificidade com o substrato. Em aplicações biotecnológicas e em síntese orgânica são amplamente empregadas as espécies oriundas de fungos e bactérias por favorecerem um processo de obtenção de enzima em meio extracelular, facilitando a sua extração do meio fermentativo (FERRAZ et al., 2018).

As lipases comerciais mais utilizadas em estudos envolvendo imobilização são obtidas a partir de espécies bacterianas como os *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia*; de leveduras como a *Cândida rugosa* e *Cândida antarctica*; e de espécies fungidas dos gênero *Rhizopus*, *Apergillus*, *Penicillium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Rhizomucor* e *Thermomyces lanuginosus* (FERRAZ et al., 2018). A empresa Novo Nordisk foi a pioneira no desenvolvimento de lipases comerciais e em 1988, conseguiu produzir lipases naturalmente por uma cepa do fungo de *Humicola lanuginosus* em quantidades

baixas para comercialização. Na tentativa de aumentar o seu rendimento, o gene que codifica essa lipase foi clonado e inserido no fungo *Aspergillus oryzae*. Já em 1994, a empresa iniciou a comercialização da primeira lipase comercial, Lipolase[®], que se originou a partir do fungo *Thermomyces lanuginosus* (TLL) e foi também expressa em *Aspergillus oryzae* (HASAN; SHAH; HAMEED, 2006; JAEGER; REETZ, 1998).

A TLL é constituída por uma única cadeia de 269 resíduos de aminoácidos, massa molecular de 31,7 kDa, ponto isoeletrico de 4,4, estável na faixa de 20°C a 50°C e com atividade máxima em pH 8,0 (FERNANDEZ – LAFUENTES, 2010).

Figura 10- Representação das conformações fechadas (em roxo) e aberta (em laranja) da lipase *Thermomyces lanuginosus*.



Fonte: KHAN et al., 2017.

Sua estrutura é aproximadamente esférica com 35 Å x 45 Å x 50 Å. Seu sítio catalítico é composto pelos aminoácidos Ser¹⁴⁶ - Asp²⁰¹ - HIS²⁵⁸, protegido do meio externo por uma tampa flexível composta pelos aminoácidos Ile⁸⁶ - Glu⁸⁷ - Asn⁸⁸ - Trp⁸⁹ - Ile⁹⁰ - Gly⁹¹ - Asn⁹² - Leu⁹³ (figura 10). A alta mobilidade da tampa em meio aquoso implica que, mesmo na ausência de uma verdadeira interface óleo - água, há um equilíbrio sutil entre as duas conformações da enzima (DEREWENDA; SWENSON; WEI, 1994).

Vários suportes são relatados na literatura como alternativa para a imobilização de enzimas nos mais diversos métodos. Ainda assim, a escolha do suporte para uma determinada aplicação deve considerar a sua área superficial, permeabilidade, insolubilidade, capacidade de regeneração, morfologia, natureza hidrofílica ou hidrofóbica, resistência mecânica, custo, entre outros (DALLA – VECCHIA; NASCIMENTO; SOLDI, 2004). Esses podem ser classificados em orgânicos (naturais e sintéticos) e inorgânicos (minerais e fabricados). Dentre os orgânicos são geralmente

usados a celulose, ágar, agarose, quitosana, quitina, poliestireno, poliacrilatos e polivinílicos, enquanto que, dos suportes inorgânicos são usados vidro, cerâmica, aluminossilicatos e, principalmente a sílica de porosidade controlada e óxidos inorgânicos em geral (DE CASTRO et al., 2008).

Para ser efetivo na imobilização o suporte deve propiciar a acessibilidade da enzima ao substrato mantendo a sua atividade por um longo período e permitir que o conjugado enzima/suporte seja recuperado sem perda de atividade no final do processo (MATEO et al., 2007).

Nesse sentido, são reportados na literatura diversos trabalhos que utilizam os mais diversificados tipos de suporte: magnéticos, poliméricos, quitosana, grafeno entre outros (CIPOLATTI et al., 2014a; TAN; FENG; JI, 2012; PURI; BARROW; TANG; QIAN; SHI, 2007; PURI; BARROW; VERMA, 2013) na imobilização de lipases para serem aplicados como catalisadores em síntese de ésteres. Utilizando a expressão “lipase immobilization” na base de dados Science Direct, foi observado que o número de publicações relacionadas a imobilização de lipases durante os últimos 15 anos vem crescendo de forma linear. Em 2004 foram reportados aproximadamente 320 publicações, enquanto que em 2018 foram publicados 956 artigos e em 2019, mais de 1000 trabalhos já foram descritos na literatura, demonstrando o esforço científico em melhorar a eficiência dos processos industriais relacionados a aplicação desse tipo de enzima, com a criação e modificação de metodologias para aumentar a eficiência e ao mesmo tempo, baratear os processos.

Li et al. (2016) sintetizaram dois polímeros à base de resina usando acrilato de etileno glicol maleico (EGMRA) como agente reticulante para imobilizar lipase do pâncreas suíno, retendo 98% da atividade inicial da enzima durante 10 ciclos de reutilização; Gao et al. (2018) utilizaram TiO_2 mesoporoso funcionalizado com fenilaminopropiltrimetoxissilano (Ph - TiO_2) para imobilizar a lipase *Burkholderia ambifaria*, mantendo 80 % da atividade após 10 ciclos; Quintana et al. (2015) imobilizaram lipase *Rhizopus oryzae* em octadecil para catalisar reações de ésteres quenodeoxicólico, mantendo 90% da sua atividade durante 3 ciclos.

Lipase *Geotrichum candidum* foi imobilizada em zeolitas (MALDONADO et al., 2015) e agarose (FERREIRA et al., 2018), mantendo 66 % e 22,8 % respectivamente, da sua atividade catalítica; Rueda et al. (2016) imobilizaram as lipases *Cândida antarctica*, *Thermomyces lanuginosus* e *Rhizomucor miehei* em glioxil – octil – agarose. Todos os processos de imobilização recuperaram aproximadamente 90 % da atividade

inicial da enzima na presença de acetonitrila; Jiang et al. (2019) desenvolveram nanopartículas mesoporosas de sílica de formato esférico funcionalizadas com nanotubos de carbono para imobilizar a lipase *Cândida antarctica* via método de ligação covalente mantendo 75,7 % após 9 ciclos de reação; a lipase *Thermomyces lanuginosus* foi imobilizada por ligações covalentes em copolímeros de estireno de divinilbenzeno ativo por poliglutaraldeído para catalisar a metanólise de óleo de canola para produção de biodiesel (DIZGE; KESKINLER; TANRISEVEN, 2009), em materiais mesoporosos de sílica com recuperação de 21,2 % da sua atividade inicial (ZHOU et al., 2015), e em matérias de carbono porosas por adsorção física, mantendo 100% da sua atividade inicial por 5 ciclos (REICHARDT et al., 2018).

Contudo, uma das lipases mais estudada é a *Cândida rugosa*. Patel et al. (2015) empregaram oxido de grafeno como suporte para imobilização da lipase *Cândida rugosa* na síntese do éster caprilato de etila, mantendo 50% da sua atividade após 30 ciclos de reutilização; Zhang et al. (2015) prepararam microesferas de poli (acetato de vinila – acrilamida) modificadas com grupos epoxi, mantendo 47,5 % da sua atividade catalítica; e Bi et al. (2016) sintetizaram oleato de oleíla através de uma reação de esterificação em resina macroporosa reticulada com dextrano. Em condições ótimas de reação, obtiveram 86,7 % de conversão após 8 ciclos.

A utilização de nanopartículas magnéticas (NPM) como suportes para a imobilização de enzimas, geralmente 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 nanopartículas com as enzimas. As moléculas mais utilizadas para a funcionalização das NPM são os carboxilatos (como ácido cítrico, citrato de sódio e ácido oléico), os polímeros sintéticos (como PEG, PVA, PEO e triton X-100) e os polissacarídeos naturais (como dextrano e quitosana) (LIN et al., 2008). Com a funcionalização, as atividades enzimáticas e as estabilidades são significativamente melhoradas, permitindo maior resistência destas em contato com o ar, estabilidade ao pH, estabilidade coloidal e a ligação com agentes externos (GUO, 2004; HOLA et al., 2015).

Do mesmo modo, dentre as modificações de superfície que podem ocorrer, a adição de grupos funcionais específicos podem ser pré requisitos para determinar o suporte adequado para a imobilização de uma enzima em uma superfície sólida (WU et al., 2012). Um dos grupos mais utilizados na realização de ligações covalentes entre a

enzima e o suporte são os agentes silanos, a qual ocorre por meio da reação entre grupos reativos do tipo alcoxi (metoxi, etoxi) presentes em alcoxissilanos mono, bi ou trifuncionais tais como: 3- aminopropiltrimetoxisilano, epicloriglucina, glutaraldeído, formaldeído, 1-etil- 3- -[3-dimetilaminopropil] carbodiimida, etilenodiamina, carbonildiimidazol e outros (MENDES et al., 2011).

Robinson; Dunnill; Lilly (1973) foram os primeiros a utilizarem a separação magnética em biotecnologia, usaram sílica e celulose com óxido de ferro (magnetita) como suporte para imobilizar α – quimiotripsina e β – galactosidase para aplicação em biorreatores. A partir desse estudo, a separação magnética se tornou uma estratégia de separação interessante em processos biotecnológicos e como matriz para imobilização de enzimas (ATACAN; OZACAR, 2015).

Vários trabalhos descrevem a imobilização de lipases em suportes magnéticos, envolvendo a combinação de diferentes tipos de suportes e protocolos de imobilização, sendo que as mais relevantes são apresentadas na tabela 2.

Tabela 2- Exemplos de publicações aplicando nanopartículas magnéticas para a imobilização de lipases.

Fonte de lipase	Suporte	Método de imobilização	Atividade recuperada	Ciclos de reutilizações	Referências
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<u>NPM@quitosana</u>	Ligação covalente	70%	10	Wang et al., 2015
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	<u>NPM@poliaziridina @glutaraldeído</u>	Ligação covalente	80%	12	Khoobi et al., 2015
<i>Cândida rugosa</i>	<u>NPM@quitosana</u>	Ligação covalente	94%	5	Sikora et al., 2016
<i>Cândida rugosa</i>	<u>NPM@APTES@ glutaraldeído</u>	Ligação covalente	87%	8	Hajar; Vahabzadeh, 2016
<i>Cândida rugosa</i>	<u>NPM@SiO₂</u>	Ligação covalente	85%	10	Gao et al., 2017
<i>Burkholderia cepacia</i>	<u>NPM@dendrímero</u>	Ligação covalente	100%	8	LI et al., 2018
<i>Cândida antarctica</i>	<u>NPM@APTES@ glutaraldeído</u>	Ligação covalente	70%	5	Miao et al., 2018
<i>Cândida antarctica</i>	<u>NPM@quitosana</u>	Ligação covalente	85%	2	Hosseini et al., 2019
<i>Rhizopus</i>	<u>NPM@amido dialdeído</u>	Ligação covalente	54%	6	Yang et al., 2019

Fonte: Elaborado pelo autor.

Um dos primeiros trabalhos relatando o uso de NPM para a imobilização de lipases foi descrito por Reetz et al. (1998), onde a lipase simultaneamente com as NPM foram encapsuladas em um material hidrofóbico derivado do trimetilmetoxissilano através de um processo sol-gel. Atualmente, Li et al. (2018) usaram nanopartículas magnéticas funcionalizadas com dendrímeros de melamina para imobilizar a lipase *Burkholderia cepacia* e catalisar a reação quiral entre 1 feniletanol e acetato de vinila. O processo resultou na presença de várias espécies enantioméricas, entretanto, manteve a atividade inicial da enzima em 100% por 8 ciclos de reação; Miao et al. (2018) funcionalizaram com APTES (3-aminopropiltriétoxissilano) nanopartículas magnéticas usando glutaraldeído como braço espessador para imobilizar covalentemente a lipase, esse material foi usado para catalisar a reação de éster metílico, mantendo 70 % da sua atividade por 5 ciclos de reação; e Hosseini et al. (2019) sintetizaram nanopartículas magnéticas reticuladas por quitosana para imobilizar a lipase *Cândida antarctica* com glutaraldeído, mantendo 85 % da sua atividade inicial durante os dois primeiros ciclos de reação, a partir do terceiro foi observado uma perda de 15 a 25 % na atividade do biocatalisador.

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 a imobilização através de ligações covalentes são os mais representativos, apresentando alguns dos melhores resultados em relação à estabilidade e atividade recuperada dos derivados enzimáticos, quando comparado com outras metodologias (HENRIQUES,2016).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

De forma geral, as investigações ocorreram em três etapas:—A primeira etapa foi realizada a síntese e caracterização, por diferentes técnicas, das nanopartículas magnéticas candidatas a suporte para imobilização da TLL; na segunda etapa foram avaliados métodos de imobilização e estabilidade da TLL na superfície das nanopartículas sintetizadas. Por fim, na terceira etapa o conjugado enzima – nanopartícula foi avaliado quanto a manutenção da atividade enzimática e a estabilidade em sucessivos processos de separação e reuso.

4.1 Materiais

Os reagentes utilizados durante a síntese e caracterização das amostras apresentaram pureza analítica e não houve tratamento prévio de purificação. Os materiais utilizados foram: sulfato de ferro (II) Heptahidratado (99%, Sigma Aldrich), cloreto de ferro (III) anidro (99%, Vetec), hidróxido de sódio (99%, Sigma Aldrich). Foram utilizados como solvente água deionizada, a partir de um sistema de purificação de água MILLI-Q (resistividade de 18,2 M Ω cm, Millipore, Bedford, EUA). Para a imobilização foi utilizada a lipase TLL (Sigma Aldrich). Outros reagentes utilizados foram: acetona p.a (Merck); Albumina sérica bovina (BSA), (Sigma Aldrich), etanol comercial, Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad), goma arábica em pó pura (85%, VETEC), azeite de oliva comercial. Nas sínteses foi utilizado o gás nitrogênio (N₂) (99%, White Martins).

4.2 Síntese das Nanopartículas Magnéticas

As NPM foram obtidas de acordo com o método de coprecipitação desenvolvido por (PARK et al., 2011), com algumas modificações. Preparou-se uma solução de FeSO₄.7 H₂O(s) em que 3,4808g do reagente foram dissolvidos em 51 mL de água deionizada. Uma segunda solução foi preparada, em que 4,0735g de FeCl₃ (s) foram dissolvidos também em 51 mL de água deionizada. Em um balão de três vias, de fundo redondo (250 mL), essas soluções foram vertidas e colocadas sob agitação de 1,5.10² rpm em atmosfera de nitrogênio. Posteriormente, foi preparada uma solução de 20 mL de NaOH 10 mol.L⁻¹, essa foi gotejada no balão de síntese a partir de uma bomba peristáltica para obter um controle de fluxo de 4 a 6 gotas por minuto. Após a conclusão da síntese, o produto foi transferido para um béquer e submetido à ação de um campo

magnético para ser recuperada. O material foi lavado até pH neutro ser obtido e secado em estufa à 60°C, sob vácuo, por 24h.

4.3 Imobilização da TLL nas Nanopartículas Magnéticas

Inicialmente, 300 mg das nanopartículas foram incubadas em etanol 95 % para retirar possíveis impurezas da superfície e mantido sobre condições estáticas por 24 h. Após esse período, as nanopartículas foram lavadas com água deionizada e recuperadas com um ímã. Com as nanopartículas ainda úmidas foram adicionados 10 mg da TLL (571 µL da solução comercial de TLL 17,5 mg.mL⁻¹) e 18,43 mL de tampão acetato pH 4,0, 5 mM por 24h sob agitação de 200 rpm a 25 °C em um shaker. O mesmo procedimento foi realizado em tampão acetato pH 4,6, 5 mM e em tampão fosfato pH 8,0, 5 mM.

4.4 Atividade Hidrolítica da TLL imobilizada nas NPM

A atividade hidrolítica foi determinada pelo método de hidrólise da emulsão de azeite de oliva, conforme metodologia adaptada de (SOARES et al., 1999). O substrato foi preparado pela emulsão de 30 g de azeite de oliva e 90 g de solução de goma arábica a 3% (m/m). Em um erlenmeyer de 125 mL foram adicionados 5 g de substrato, 5 g de solução tampão fosfato de sódio pH 8,0 (100 mM) e adicionados 20 µL da amostra a ser analisada. Os frascos foram incubados a 37 °C por 5 min, em banho termostatizado com agitação de 200 rpm. Após o período de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 10 mL de uma solução de etanol/acetona (1:1). Os ácidos graxos liberados foram titulados com solução de NaOH e utilizando fenolftaleína como indicador (3 gotas). O cálculo da atividade hidrolítica foi realizado de acordo com a equação (4).

Em paralelo, foram realizadas duas reações controle empregando azeite de oliva emulsificado sem a adição de enzimas. A atividade hidrolítica foi expressa em mmol.mL⁻¹.min⁻¹.

$$U \text{ (mmol.mL}^{-1}\text{.min}^{-1}\text{)} = \frac{(V_a - V_b) \cdot M \cdot 10^3}{t \cdot V_{enz}} \quad \text{(equação 4)}$$

Em que: M é a concentração molar da solução de NaOH (mol/L); V_{enz} é o volume de enzima solúvel (mL); t é o tempo de reação (min); V_a é o volume de NaOH gasto na titulação da amostra (mL) e V_b é o volume do NaOH gasto na titulação do controle

(mL).

4.5 Determinação do teor de enzima imobilizada

A partir do método de Bradford (1976) foi pesada a massa de 10 mg do corante azul brilhante “Commassie Brilliant Blue G-250” e dissolvido em 5 mL de metanol e posteriormente, 10 mL de ácido fosfórico (85% P.A) foram adicionados. Transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água deionizada. Em seguida, procedeu-se uma filtração simples da solução e esta foi armazenada em um frasco âmbar revestido com papel alumínio e armazenada na geladeira a 4°C

A concentração de proteína foi expressa a partir da construção de uma curva analítica de calibração utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, na faixa de concentração entre 2 e 15 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para isso, foram retiradas alíquotas de uma solução estoque de BSA 0,100 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 2700 μL do corante Bradford e o restante do volume foi preenchido com água deionizada até completar o volume de 3000 μL .

Após o preparo das soluções utilizadas na construção da curva de calibração, essas foram analisadas em um espectrofotômetro de UV-Vis no comprimento de onda de 595 nm em triplicata.

Para as medidas espectrofotométricas das amostras provenientes do processo de imobilização, foram pipetados 30 μL de cada amostra, 270 μL de água deionizada e 2700 μL do reagente de Bradford e incubado por 10 minutos. Após, em uma cubeta de vidro, foram realizadas as medidas de absorbância em triplicata no comprimento de onda de 595 nm. A partir da curva de calibração, foi determinada a concentração da TLL no sobrenadante do processo de imobilização, auxiliando na determinação do teor da enzima TLL na superfície da nanopartícula por diferença.

As amostras de NPM@TLL também foram analisadas por espectroscopia de fluorescência em temperatura ambiente através do espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian), que possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a largura a meia altura do pulso de aproximadamente 2 μs e potência de pico equivalente a 75 KW. As amostras foram preparadas com 2 mL de água deionizada e 50 μL do sobrenadante do material imobilizado. Em seguida, foram excitadas em 279 nm e a fluorescência foi coletada entre 300 e 450 nm, com intensidade máxima em 340 nm. A

partir da curva de calibração, foi determinada a concentração da TLL no sobrenadante do processo de imobilização.

4.6 Estudo da dessorção das NPM@TLL nos diferentes pHs.

Esse teste decorreu ressuspendendo inicialmente as NPM em um tubo falcon de 15 mL, 200 μ L do material imobilizado (NPM@TLL) nos pHs 4,0; 4,6; e 8,0 em 10 mL de água deionizada. Em seguida, essa suspensão foi agitada por 5 minutos em uma lavadora ultrassônica. Após, colocou-se o tubo falcon sobre um imã e separou-se o sobrenadante do material imobilizado para posterior análise no espectrofotômetro pelo método de Bradford. Esse procedimento foi repetido 5 vezes por cada réplica e em triplicata.

O mesmo procedimento foi conduzido para análise por espectroscopia de fluorescência, ressuspendendo 20 mg de NPM@TLL em 2 mL de água deionizada nas mesmas condições descritas no estudo 4.5.

4.7 Estudo da Interação entre a enzima TLL e as NPM e seus parâmetros termodinâmicos

Os espectros de fluorescência foram obtidos a temperatura ambiente através do espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian), que possui como fonte de excitação uma lâmpada pulsada de Xenônio (80 Hz), com a largura a meia altura do pulso de aproximadamente 2 μ s e potência de pico equivalente a 75 KW, excitadas em 279 nm e a fluorescência foi coletada entre 300 e 450 nm, com intensidade máxima em 340 nm.

Inicialmente foi preparado uma solução de NPM 2,0 mg.mL⁻¹ em tampão acetato pH 4,0, as nanopartículas foram dispersas por 2 minutos em banho ultrassônico. Em seguida, 2,0 mL de tampão acetato pH 4,0 foram adicionados a cubeta de quartzo e excitadas em 279 nm, com varredura de 300 a 450 nm. Logo, foi adicionado 20 μ L da solução de TLL (17,5 mg.mL⁻¹) na cubeta contendo 2 mL de tampão. Posteriormente, foram realizadas adições seriadas de 5 μ L da dispersão de NPM 2 mg.mL⁻¹ até completar o volume de 50 μ L. A partir da equação de Stern–Volmer foi determinado a constante de associação e conseqüentemente, a energia livre de Gibbs padrão da interação TLL@NPM.

Para determinar os demais parâmetros termodinâmicos (ΔH° e ΔS°) o mesmo experimento foi repetido em diferentes temperaturas, 298,15 K (25°C); 303,15 K (30°C) e 308,15 K (35°C) e os valores obtidos foram aplicados a equação de Van't Hoff.

4.8 Determinação da eficiência catalítica das NPM@TLL

As condições experimentais da síntese de éster utilizando 1 decanol e ácido oléico utilizadas nos testes catalíticos do biocatalisador (NPM@TLL) foram otimizadas por Miguez et al. (2018), avaliando o efeito da temperatura (30 a 70°C), a concentração do biocatalisador (21% m/v) e a razão molar de ácido:álcool (1:0,5 a 1:1,5) na porcentagem de conversão em éster. Cada ciclo de reação entre o 1 Decanol e o ácido oléico teve duração de 180 min em sistema isento de solvente orgânico, a 30°C, agitação de 150 rpm, razão molar estequiométrica de ácido:álcool e concentração de biocatalisador de 21% m/V.

Dessa forma, em um frasco de 30 mL foram adicionados 2 mL da solução contendo decanol e ácido oléico 1:1 e 0,42 g do biocatalisador (NPM@TLL). No final de cada ciclo, o biocatalisador heterogêneo foi separado do meio reacional com um ímã e lavado duas vezes com 3 mL de hexano gelado para remover moléculas do substrato e/ou produtos retidos no biocatalisador e este, foi ressuspendido em um novo substrato.

A porcentagem de conversão do éster foi determinada ao final de cada ciclo, a partir do consumo de ácido oléico na reação, adicionando 200 μ L do meio reacional, 2 gotas de uma solução de fenolftaleína em 10 mL de uma solução etanol/acetona na proporção de 1:1 e titulado com uma solução de NaOH. Para determinação da taxa de conversão foi utilizada a equação(5) abaixo:

$$\text{Taxa de conversão (\%)} = \frac{V_{\text{NaOH inicial}} - V_{\text{NaOH final}}}{V_{\text{NaOH inicial}}} \times 100 \quad (\text{equação 5})$$

4.9 Técnicas de Caracterização

As metodologias usadas na caracterização dos materiais são descritas nessa subseção.

4.9.1 Difração de Raios-X (DRX)

As NPM@TLL foram caracterizadas em um difratômetro da RIGAKU, modelo ULTIMA IV. Durante os experimentos foi empregado a radiação $\text{CuK}\alpha$ (tubo selado) usando ótica instrumental de feixe paralelo, com comprimento de onda (λ) igual a 0,15406 nm, voltagem de 40 kV e corrente de 30 mA. As medidas foram realizadas na forma de pó em modo contínuo com velocidade de $0,5^\circ$ por min, em um intervalo 2θ de 20° e 70° , gravando-se a contagem a cada $0,02^\circ$ por min. Os difratogramas foram comparados com o difratograma padrão da magnetita disponível no Cambridge Crystallographic Database (CSD).

4.9.2 Potencial Zeta (ζ)

O potencial zeta foi determinado no equipamento Zetasizer Nano ZS, Malvern. As análises foram realizadas com base na diluição de uma suspensão de nanopartículas que se apresentava na concentração de $2,5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ para uma concentração de $0,07 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$. Todas as amostras foram preparadas em água deionizada com prévia modificação de seu pH utilizando um pHmetro digital (modelo mPA-210), com eletrodo de pH blindado semi-sólido e líquidos da Sensoglass[®], Modelo SC06 N/S: 00829-15. A mudança de pH da água foi realizada a partir de soluções de NaOH e HCl nas concentrações de 0,1 e $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$. As amostras foram tituladas no intervalo de pH de 3 a 12 com um intervalo de pH de 1,0. Para análise, o potencial zeta foi configurado tendo como dispersante a água com viscosidade de 0,8872 cP, índice de refração de 1,330, condutividade elétrica de 78,5 e temperatura de 25°C .

4.9.3 Espalhamento dinâmico de Luz (DLS)

Os ensaios de distribuição de tamanho por espalhamento dinâmico de luz (DLS) foram realizados no instrumento Malvern Zetasizer Nano ZS. Amostras foram preparadas a partir da dispersão de 6 mg de NPM em 2 mL de etileno glicol, a mistura permaneceu por 30 minutos em banho ultrassônico, e por fim, a dispersão foi filtrada em filtro de 0,11 mm (MillexLCR 25 mm, Millipore). Foram preparadas duas amostras e para cada uma, o equipamento realizou 3 medidas de tamanho hidrodinâmico (D_H). O mesmo procedimento foi realizado para as amostras NPM@TLL.

4.9.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

As amostras NPM e NPM@TLL foram dispersas em álcool isopropílico na concentração de 1 mg.mL^{-1} em rede de grafite e examinadas em um microscópio eletrônico de transmissão da FEI – Tecnai G20 com filamento LaB6 operando a 200 kV e spot tamanho 3. As medidas foram realizadas na Central Analítica da Universidade de São Paulo (USP).

4.9.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para a análise no AFM foram preparadas dispersão de NPM e NPM@TLL na concentração de 1 mg.mL^{-1} em álcool isopropílico, em seguida, foram colocadas no ultrassom por 30 min. Após, $10 \mu\text{L}$ de cada amostra foram depositadas em uma placa de vidro de $1 \times 1 \text{ mm}$ e levadas a estufa a 40°C por 24 h para evaporação do solvente.

O microscópio de força atômica empregado no estudo foi o NX10 da Park Systems, pertencente ao laboratório de Microscopia de Força Atômica (LabAFM) – UNIFAL-MG. O modo de varredura foi o não contato, as imagens foram obtidas para áreas de varreduras de $3,5 \times 3,5 \mu\text{m}^2$ e o tratamento das imagens foram feitas a partir dos software XEI e Gwyddion, todos de acesso livre.

4.9.6 Espectroscopia de Infravermelho (FTIR)

Foi empregado um espectrofotômetro da marca Thermo Scientific Nicolet, modelo IS 50 FT-IR, com acessório de refletância total atenuada horizontal empregando um cristal de seleneto de zinco (ZnSe). O espectro da NPM foi obtido sem nenhum preparo prévio no intervalo de $4000 \text{ a } 500 \text{ cm}^{-1}$ com resolução espectral de 4 cm^{-1} e 32 varreduras.

4.9.7 Análise Termogravimétrica

Os ensaios foram executados no intervalo de temperatura de 25°C a 1000°C , razão de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, sob fluxo de ar sintético, vazão de 100 mL min^{-1} , em cadinho de alumina, com massa de amostra entre 10 e 20 mg, empregando uma termobalança. O equipamento utilizado foi o TG-DTA-SDT, modelo Q600 (TA

Instruments). As medidas foram realizadas no Laboratório Interdisciplinar de Química – LabIQ, localizado na Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG.

4.9.8 Mapeamento computacional do Potencial eletrostático da TLL

Analisando o Protein Data Bank (PDB) constatou-se que a lipase do organismo *Thermomyces lanuginosus* possui estrutura tridimensional resolvida tanto na sua conformação “fechada” (PDB: 1DT3) quanto na sua conformação “aberta” (PDB:1EIN). Ambas estão registradas sob o código UniProKB O59952 através do domínio (<https://www.uniprot.org/uniprot/O59952>).

Diante disto, o mapeamento da superfície eletrostática da lipase foi realizado utilizando a estrutura 1EIN na interface Maestro 11.2. Inicialmente, essa estrutura foi reduzida a monômero desconsiderando as moléculas de H₂O que estavam co-cristalizadas junto à estrutura. Posteriormente, ocorreu um pré-processamento, onde: adicionou-se hidrogênios aos átomos que não os possuíam; preencheram-se as correntes laterais; completaram-se os loops perdidos e adicionaram-se grupos N-acetil e N-metilamida aos terminais N e C destapados.

Por fim, gerou-se a superfície eletrostática da enzima com os prováveis estados de ionização e tautoméricos em cada faixa de pH analisada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Essa seção foi dividida em três momentos com a intenção de organizar a descrição da caracterização das nanopartículas magnéticas, da lipase TLL e por fim, descrever os resultados da união entre esses materiais, discutindo a obtenção por adsorção física de um novo biocatalisador

5.1 Caracterização das nanopartículas magnéticas

Nanopartículas magnéticas provenientes de óxidos de ferro foram sintetizadas através do método de coprecipitação dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em meio aquoso por adição de uma base que, por sua vez, se mostrou um processo simples em relação a outras metodologias relatadas na literatura.

Esse método possibilita a realização da síntese de NPM em condições ambientes ou com baixa elevação na temperatura produzindo partículas pequenas, de alta pureza, com forma definida e com pequenas variações de tamanho. O ajuste do tamanho e forma das nanopartículas depende do estabelecimento das condições de controle, tais como: concentração dos íons, relação estequiométrica; pH da solução, tempo de síntese, concentração do agente redutor; velocidade de agitação, temperatura entre outras (KIM; KIM; LEE, 2003). E em especial na preparação da síntese de NPM, o índice de umidade relativa do ar é um parâmetro que deve ser considerado, visto que, se o índice superar os 60%, a formação do óxido de ferro Fe_3O_4 começa a ser comprometida devido à saturação do ambiente reacional por moléculas de oxigênio atmosférico colaborar para a formação de outras espécies de óxidos de ferro que possuem uma menor susceptibilidade magnética quando comparados com a espécie Fe_3O_4 , impedindo a separação do precipitado formado por magnetização externa (BRAVO, 2017).

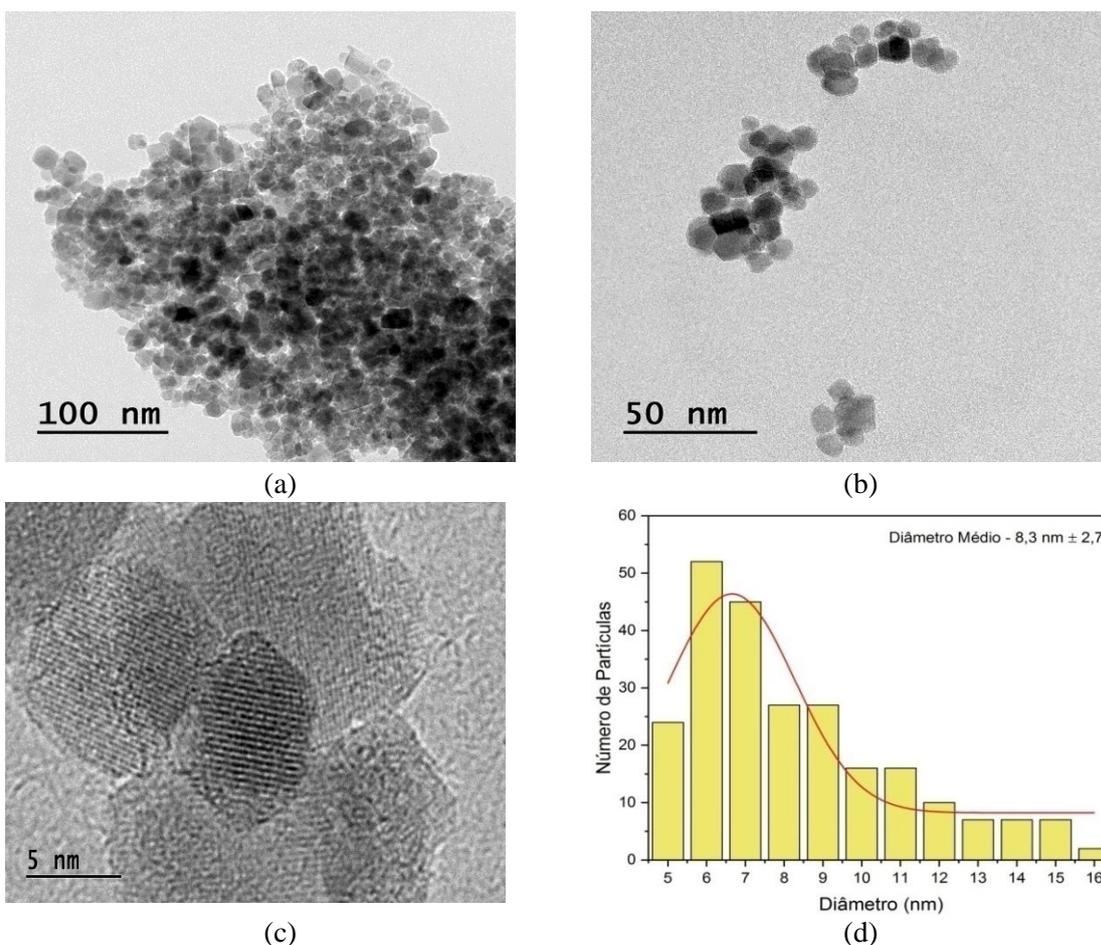
Além disso, a dificuldade enfrentada na síntese de NPM em obter materiais monodispersos consiste em dois processos que ocorrem durante a síntese de maneira simultânea, porém que, precisam ser levados em consideração para alcançar tamanhos mais homogêneos. O primeiro deles é a nucleação, que consiste na formação de clusters atômicos de forma homogênea e o fenômeno de crescimento, que remete a agregação dos núcleos atômicos para formação das nanopartículas. Uma dispersão reduzida é obtida quando a nucleação ocorre rapidamente em um curto período de tempo seguido de uma etapa de crescimento lenta sem que ocorra nucleação significativa (SOUZA, 2011). Dessa forma, o modo como o agente redutor (base) é adicionado à solução

contendo os íons Fe^{+2} e Fe^{+3} é primordial na tentativa de se obter nanopartículas mais homogêneas

Assim, nas micrografias de TEM é possível identificar NPM com baixa polidispersidade e morfologia próxima a uma esfera em diferentes escalas (figuras a, b e c). Já o tamanho das partículas foi obtido a partir de um histograma de distribuição de tamanho medindo-se o diâmetro de nanopartículas contidas nas imagens de TEM, utilizando o *software ImageJ*.

Considerando que as nanopartículas possuem um formato esférico, o histograma foi obtido a partir da contagem de 240 nanopartículas, fornecendo um diâmetro médio na ordem de $8,3 \text{ nm} \pm 2,7$ (Figura 11d). Entretanto, é observado que uma parcela considerável das nanopartículas contabilizadas, aproximadamente 40%, possuem tamanhos entre 6 e 7 nm.

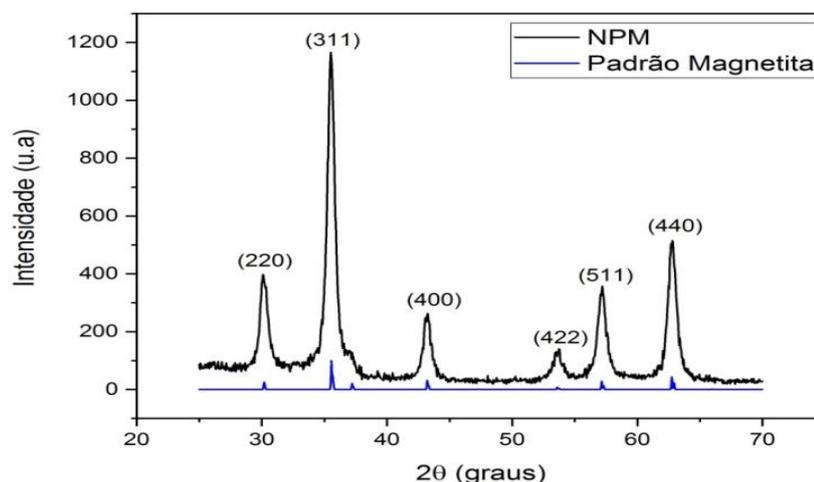
Figura 11-Caracterização das nanopartículas magnéticas por TEM. Em (a), (b) e (c) micrografias das NPM em diferentes escalas; em (d) histograma de distribuição apresentando o tamanho médio das NPM.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Pela caracterização por difratometria de raios-X foi observado na figura 12 às correspondentes difrações características dos planos da fase cristalina da magnetita (Fe_3O_4), onde os planos (220), (311), (400), (422), (511) e (440) pertencem a estrutura espinélio invertido, e os valores de 2θ encontrados foram: $30,2^\circ$; $35,6^\circ$; $43,2^\circ$; $53,65^\circ$; $57,1^\circ$ e $62,8^\circ$, respectivamente. Portanto, os valores encontrados para as NPM estão de acordo com as difrações estabelecidas como padrão para a magnetita pela International Center for Diffraction Data (ICDD).

Figura 12- Difratoograma da síntese das nanopartículas magnéticas e seu respectivo padrão.



Fonte: Elaborado pelo autor.

O potencial zeta das nanopartículas também foi medido com a finalidade de determinar a mudança da carga de superfície do material em função da variação do pH (figura 13a). Em valores de pH menores que 4,7 as NPM apresentaram cargas positivas, o que pode ser atribuído a presença de íons H^+ provenientes do ácido clorídrico presente no meio que adsorve na superfície das nanopartículas. Após esse valor, é observado o ponto isoelétrico da NPM em pH 4,75 e em valores de pH maiores, as NPM se encontram com carga negativa.

Segundo Erdemoglu; Sarikaya (2006), o ponto isoelétrico de nanopartículas magnéticas se encontra em pH próximo a 5. O valor experimental verificado para o ponto isoelétrico em 4,75 é um pouco menor do que o relatado na literatura, constituindo evidência que a superfície da NPM está mais negativa em função da presença de grupos hidroxilas residuais resultantes do processo de síntese.

Essa superfície mais negativa requer um aumento da concentração de H^+ , ou um abaixamento no pH para que ocorra a neutralização da superfície, ocasionando uma pequena variação no ponto isoelétrico do material. As espécies formadas na superfície das nanopartículas quando reagem com ácidos e bases são $FeOH$, $FeOH_2^+$ e FeO^- , conforme as equações (6) e (7). Em solução, essas alterações fazem com que as superfícies do óxido de ferro (Fe_3O_4) formem OH_2^+ e O^- , modificando assim a carga de superfície das partículas (CARLSON, 2010).

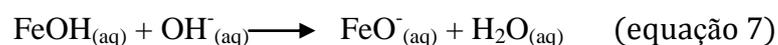
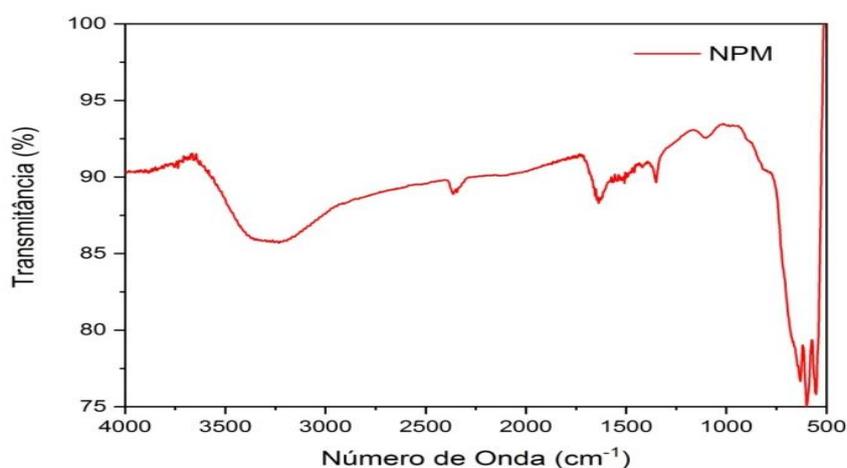
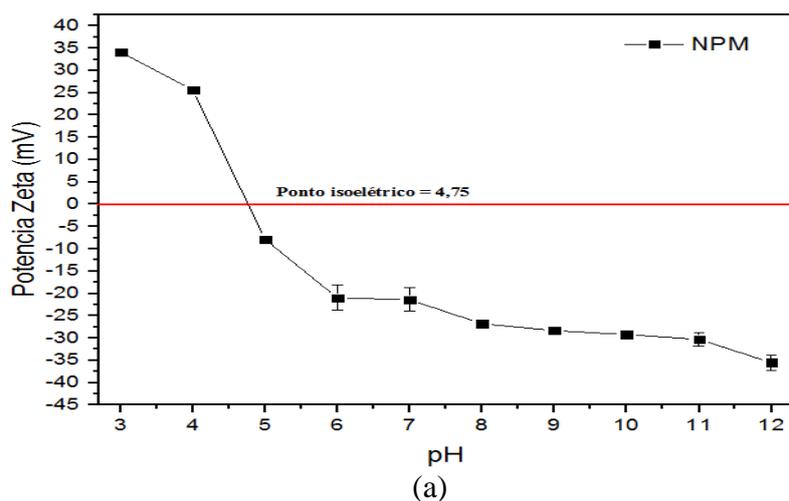


Figura 13– Caracterização das nanopartículas magnéticas por diferentes técnicas. Em (a) curva de potencial zeta das NPM em função do pH; (b) espectro da região do infravermelho da NPM sintetizada.



(b)

Fonte: Elaborado pelo autor.

E por fim, a caracterização do material por espectroscopia no infravermelho foi realizada para determinar os tipos de ligações presentes nas nanopartículas. O espectro na região do infravermelho na figura 13b apresenta as bandas características da ligação Fe-O referentes à espécie Fe_xO_y . A absorção abaixo de 700 cm^{-1} é atribuída a deformações das ligações Fe-O dos sítios octaédricos e tetraédricos do óxido de ferro na forma de magnetita (MÁRQUEZ et al., 2011). A banda larga na região de 3200 cm^{-1} a 3600 cm^{-1} e em 1639 cm^{-1} são devido a vibrações de estiramento O-H associado a presença de água e grupos hidroxilas proveniente da etapa de síntese (RĂCUCIU; CREANGĂ; AIRINEI, 2006).

5.2 Caracterização da Lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL)

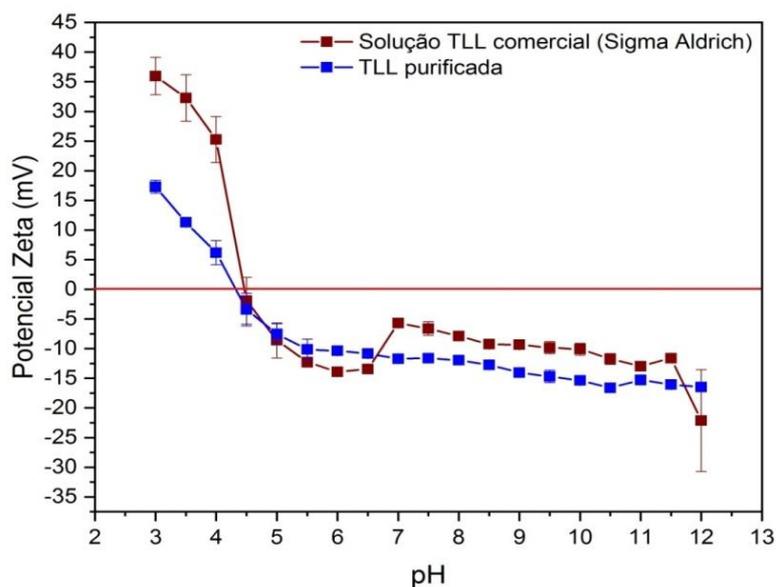
As cargas de superfície da TLL foram determinadas a partir das curvas de potencial zeta em função do pH apresentada na figura 14.

É possível observar que inicialmente a solução de TLL comercial (—■—) apresenta carga positiva até atingir pH próximo de 4,3 devido a protonação de seus aminoácidos, em pH 4,4 é observado o ponto isoelétrico da TLL e após esse valor, com o aumento do pH, os aminoácidos da enzima presentes na superfície são desprotonados ocasionando o aparecimento de uma superfície predominantemente de carga negativa nos demais valores de pH.

As medidas de potencial zeta obtidas em função da variação do pH recuperaram a informação sobre o ponto isoelétrico da TLL descritas na literatura por outras técnicas como microcalorimetria (Jha et al., 1999), métodos cromatográficos (Borkar et al., 2009), entre outras.

Entretanto, para garantir a confiabilidade desse resultado, foi realizada uma purificação da solução de TLL comercial e posterior análise do seu potencial zeta (—■—). O fabricante discrimina a existência de propilenoglicol, cloreto de cálcio, entre outras substâncias como agentes estabilizantes da enzima em solução. Assim, a solução comercial de TLL foi precipitada com acetona, centrifugada e separada do sobrenadante. Em seguida, a atividade hidrolítica da enzima purificada foi determinada e foi verificado que a atividade se manteve dentro do erro experimental, mostrando que, o processo de purificação não afetou significativamente a conformação da enzima.

Figura 14- Curva de potencial zeta da lipase *Thermomyces lanuginosus* em função do pH.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Dessa forma, foi verificado que os pontos isoelétricos da enzima purificada e da enzima em solução comercial diferem minimamente entre si, indicando que a presença de outras substâncias na solução comercial de TLL não influencia na carga de superfície da enzima.

Contudo, conhecer o potencial zeta das espécies, não garante que as mudanças de carga na superfície favoreçam o processo de imobilização, devido que os valores obtidos pelo potencial zeta remetem a carga superficial global da espécie, não definindo assim, a natureza individual de carga. Dessa forma, a junção do estudo experimental e teórico permite propor explicações a respeito do comportamento da enzima na superfície da nanopartícula.

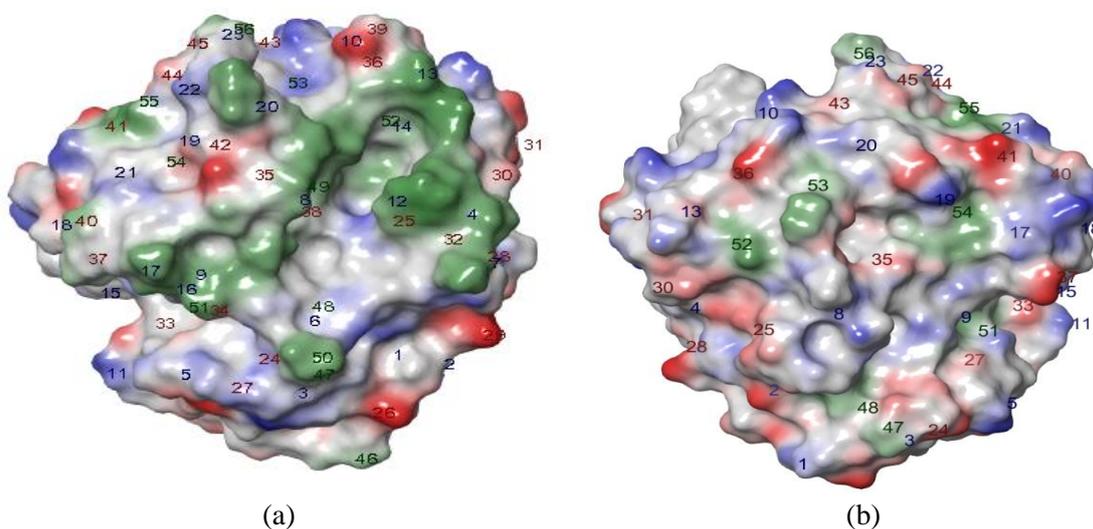
Assim, para se obter informações sobre os possíveis locais onde a TLL pode se ligar a superfície da NPM, calculamos o potencial eletrostático computacional da TLL em diferentes pHs. Foi analisada a superfície da enzima TLL em pH 4,0 e pH 8,0

Como o processo de adsorção deve ocorrer de modo a preservar a estrutura conformacional, e conseqüentemente, o sítio catalítico da enzima, o estudo teórico das propriedades relacionadas a acessibilidade e contribuição energética para o potencial eletrostático da TLL foram filtrados para as regiões opostas ao sítio catalítico. Para isso, foi alterada a posição da enzima, de modo a evidenciar o sítio catalítico na parte superior e selecionar os resíduos da parte inferior.

Em pH 4,0, dos 269 resíduos da TLL, 172 foram caracterizados como superficiais. Dentre esses, 91 possuem regiões positivas, 92 negativas e 61 hidrofóbicas. De modo geral, contabilizando todos os grupos funcionais dos aminoácidos que estão presentes na superfície da lipase, definimos os diferentes potenciais eletrostáticos dessas espécies (figura 15) os representando em regiões positivas, negativas e hidrofóbicas. A área superficial da região positiva correspondeu a 165,9 nm², enquanto a negativa, 148,3 nm² e a região hidrofóbica a 65,1 nm², indicando a prevalência de regiões positivas.

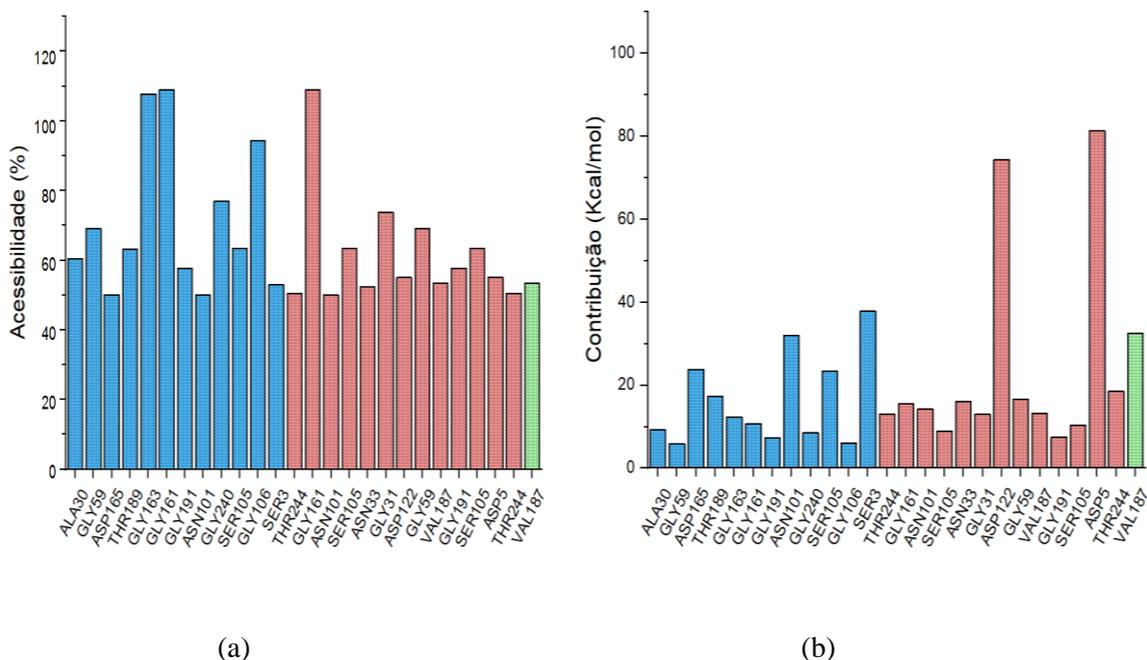
De forma a inferir sobre os possíveis grupos de aminoácidos que podem interagir com a superfície das nanopartículas preservando o sítio catalítico da enzima, foi verificado a porcentagem de acessibilidade dos resíduos que compõem as regiões opostas ao sítio catalítico. Os resultados foram filtrados na figura 16a, para aqueles aminoácidos que possuíam uma área superficial acessível ao solvente maior que 50 %.

Figura 15- Potencial eletrostático da TLL em pH 4,0. Em (a) lado frontal ao sítio catalítico; em (b) lado oposto ao sítio catalítico. As manchas azuis representam as regiões positivas, as vermelhas, as regiões negativas e as manchas em verde representam as regiões hidrofóbicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16- Potencial eletrostático da TLL em pH 4,0. Em (a) acessibilidade dos resíduos localizados na TLL; em (b) contribuição energética de cada aminoácido em com acessibilidade maior que 50% para o potencial eletrostático da enzima. Azul para região positiva, vermelho para negativa e verde para hidrofóbica.



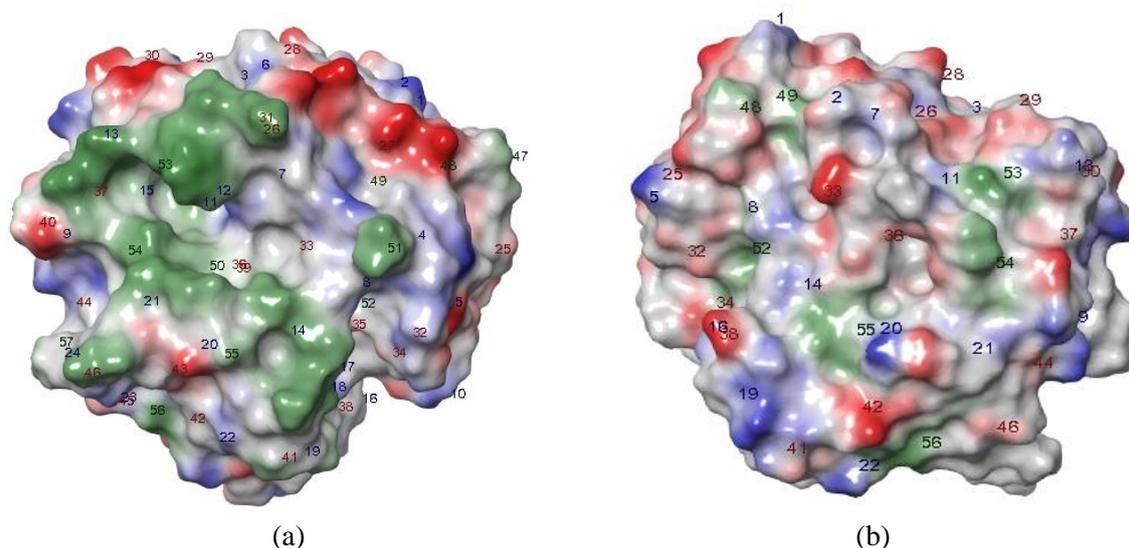
Fonte: Elaborado pelo autor.

Além da acessibilidade dos aminoácidos para o solvente, foi avaliada a contribuição energética em Kcal.mol^{-1} de cada resíduo de aminoácido para o potencial eletrostático da enzima (figura 16b). Nesse caso, foram selecionados resíduos opostos ao sítio ativo que possuem acessibilidade maior que 50%.

Observa-se uma significativa contribuição (≥ 20) de energia dos resíduos SER 3, ASN 101, ASP 165 e SER 105 nas regiões positivas; enquanto que nas regiões negativas, os resíduos ASP 5 e ASP 122 se destacam e na região hidrofóbica, destaca-se a VAL 187.

Já em pH 8,0, dos 269 resíduos da TLL, 173 foram caracterizados como superficiais. Dentre esses, 79 possuem regiões positivas, 101 negativas e 60 hidrofóbicas, conforme é mostrado na figura 17. A área superficial da região positiva corresponde a $128,7 \text{ nm}^2$, enquanto a negativa, $168,9 \text{ nm}^2$ e a região hidrofóbica a $57,2 \text{ nm}^2$, indicando a prevalência de regiões negativas.

Figura 17- Potencial eletrostático da TLL em pH 8,0. Em (a) lado frontal ao sítio catalítico; em (b) lado oposto ao sítio catalítico. As manchas azuis representam as regiões positivas, as vermelhas, as regiões negativas e as manchas em verde representam as regiões hidrofóbicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

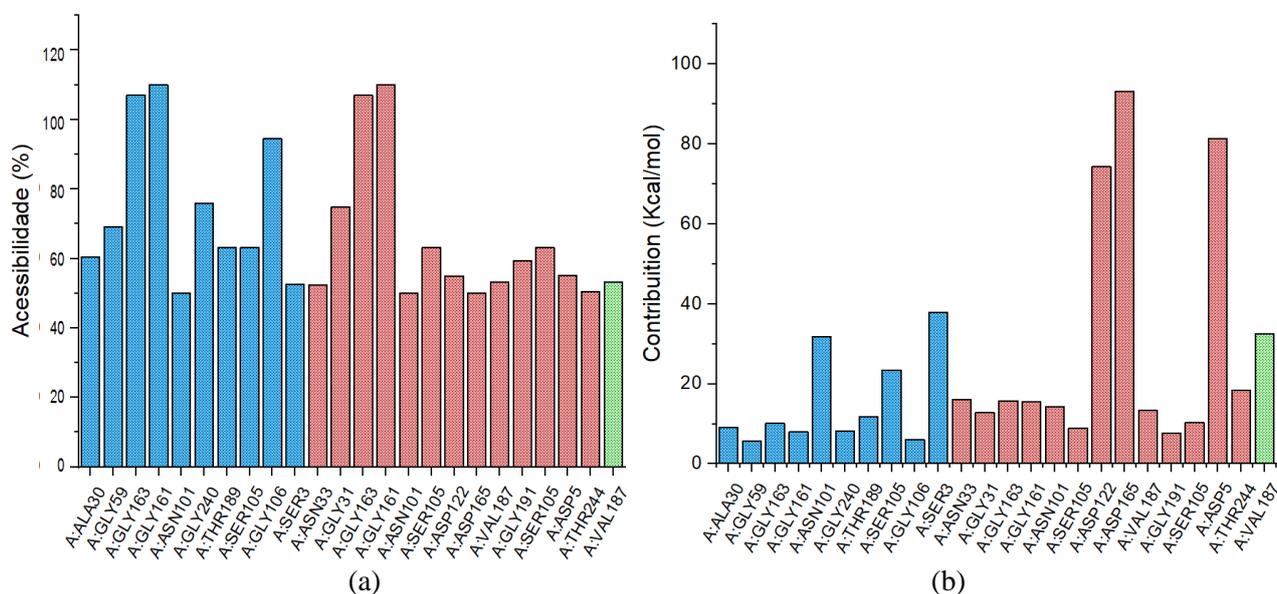
A porcentagem de acessibilidade dos aminoácidos que estão presentes no lado oposto ao sítio catalítico da enzima foram filtrados na figura 18a, considerando os aminoácidos que possuíam uma área superficial acessível ao solvente maior que 50 %.

Observa-se a presença de 4 picos ($\geq 70\%$) relacionados a regiões positivas (GLY163, GLY161, GLY240, GLY106) e de 3 picos relacionados as regiões negativas (GLY31, GLY163 e GLY161). Através do gráfico também é possível indicar a predominância de grupamento amino com carga positiva (forma catiônica) ou o grupamento ácido carboxílico com carga negativa (forma aniônica) na glicina. Os mapas de potencial eletrostático de glicinas ilustram a sua natureza dipolar que tem origem na justaposição da função carboxilato, rica em elétrons, com o grupo amino, deficiente em elétrons.

Também foi avaliada a contribuição energética em Kcal.mol^{-1} de cada resíduo de aminoácido em pH 8,0 para o potencial eletrostático da enzima (figura 18b). Nesse caso, selecionaram-se aqueles resíduos opostos ao sítio ativo que possuem acessibilidade maior que 50% a modo de averiguar suas contribuições para o sistema.

Observa-se uma significativa contribuição (≥ 30) de energia dos resíduos ASN 101, SER 105 e SER 3 nas regiões positivas; enquanto que nas regiões negativas, os resíduos ASP 122, ASP 165, ASP 5 se destacam e na região hidrofóbica, destaca-se a VAL 187.

Figura 18– Potencial eletrostático da TLL em pH 8,0. Em (a) acessibilidade dos resíduos localizados na TLL; em (b) contribuição energética de cada aminoácido com acessibilidade maior que 50% para o potencial eletrostático da enzima em pH 8,0. Azul para região positiva, vermelho para negativa e verde para hidrofóbica.



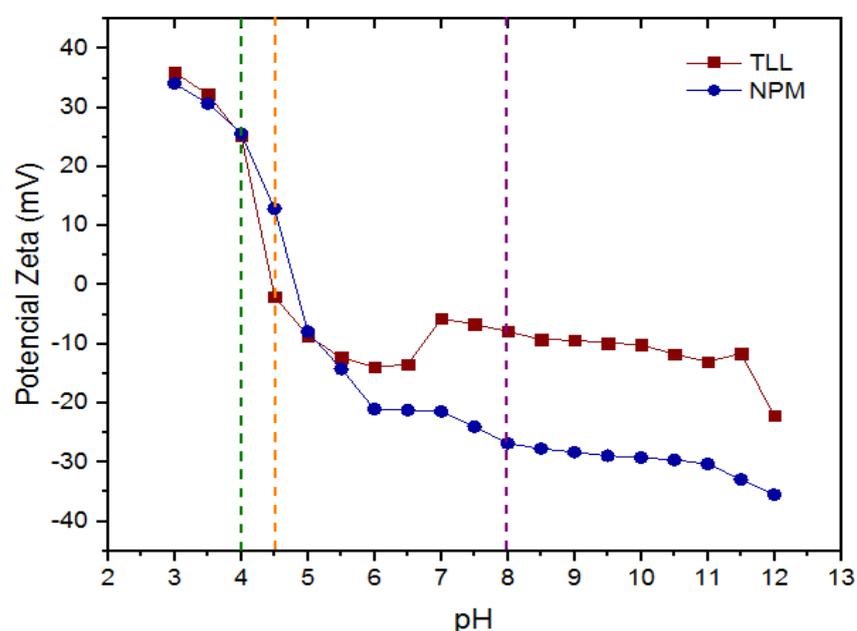
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Caracterização do Processo de Imobilização das NPM@TLL

A metodologia de imobilização por adsorção física foi estabelecida a partir da comparação do potencial zeta obtido para a TLL e as NPM. A partir dessas informações, foram escolhidos 3 diferentes pHs em que as espécies envolvidas no processo de adsorção apresentassem uma maior diferença de carga superficial (figura 19). Considerando que as forças envolvidas no processo são de baixo grau energético e de caráter eletrostático, a hipótese levantada é de que a diferença de carga estabelecida pela mudança do pH, pode favorecer a imobilização da enzima na superfície das nanopartículas.

Dessa forma, foram estabelecidas três regiões com potenciais distintos que poderiam ocasionar interações diferentes entre os materiais. Essas regiões foram determinadas em pH 4,0 (---), onde as NPM se encontram com carga superficial de +32,0 mV e a TLL +25,0 mV; em pH 4,6 (---) em que as NPM possuem +19,0 mV e a TLL -2,0 mV; e por fim, em pH 8,0 (---) no qual as NPM apresentaram -13,0 mV e a TLL -8,0 mV.

Figura 19- Comparação do potencial zeta em função do pH obtido para lipase *Thermomyces lanuginosus* e as nanopartículas magnéticas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a realização do processo de imobilização, as nanopartículas foram separadas do sobrenadante e a atividade hidrolítica das NPM@TLL produzidas nos diferentes pHs de controle, foram usados para avaliar a eficiência da adsorção da enzima na superfície das NPM. Na tabela 3, são apresentados os valores de atividade do material imobilizado e do seu sobrenadante nos diferentes pHs estudados, bem como da TLL na forma livre.

Tabela 3- Atividade enzimática das NPM@TLL produzidas em diferentes pHs.

Amostra	Atividade Média(n=5) (mmol.mL⁻¹.min⁻¹)	Desvio Padrão (mmol.mL⁻¹.min⁻¹)	Atividade Recuperada (%)
TLL pura	3815,18	76,18	100
NPM@TLL - pH 4,0	2292,44	348,00	62,3
S. NPM@TLL - pH 4,0	134,24	28,59	
NPM@TLL - pH 4,6	1019,67	173,51	28,0
S. NPM@TLL - pH 4,6	169,07	52,70	
NPM@TLL - pH 8,0	459,02	115,83	16,8
S. NPM@TLL - pH 8,0	1080,01	52,70	

*S. NPM@TLL, remete ao sobrenadante do material imobilizado (atividade residual).

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados revelaram que em todos os processos adsorptivos estudados ocorreram a imobilização da TLL, entretanto, a imobilização em pH 4,0 forneceu uma maior recuperação do valor de atividade hidrolítica, quando comparado com o valor de atividade da enzima na sua forma livre. Também foi verificado que os sobrenadantes das amostras em pH 4,0 e pH 4,6 apresentaram uma baixa porcentagem de atividade hidrolítica, mostrando que uma pequena quantidade de enzima permaneceu no meio reacional. Já em pH 8,0 é observado a recuperação de 28,3 % da atividade hidrolítica no sobrenadante, indicando a presença de grande quantidade de enzima no meio reacional.

Para tentar explicar os comportamentos acima descritos, é necessário entender que as interações que são estabelecidas em processos de adsorção ocorrem em toda a sua superfície do suporte, por isso, são ditas não especificamente dirigidas (VIDAL et al., 2014). Essa consideração nos faz compreender a dificuldade de definir e controlar qual região da enzima estará interagindo com a superfície do suporte e quais são os grupos residuais dos aminoácidos que formam a cadeia peptídica que regem essas ligações.

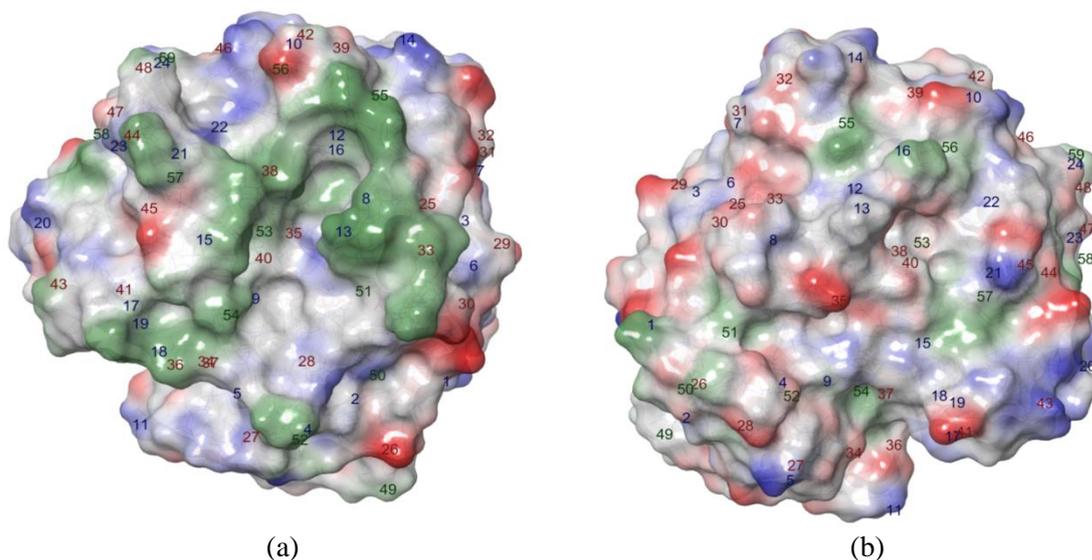
Uma tentativa de estabelecer um mecanismo que possibilite entender como a imobilização está ocorrendo é retomar os dados obtidos por mapeamento computacional do potencial eletrostático da TLL,

O potencial eletrostático computacional da TLL (seção 5.2) mostra a existência de uma grande região hidrofóbica juntamente com algumas regiões de carga positiva ao redor do sítio catalítico da TLL (figura 15). Portanto, é razoável esperar que isso promova um aumento na repulsão entre a enzima e as nanopartículas, as NPM se encontram com carga positiva em pH 4,0, o que favorece o processo de imobilização no lado oposto da enzima.

Os resíduos de aminoácido que apresentam carga negativa com maior acessibilidade para interação com o meio externo em pH 4,0 se encontram no lado oposto ao sítio catalítico da TLL (figura 16a). São eles: Gly 161 (região 25); Gly 31 (região 27); Gly 191 (região 35); Asp 5 (região 37); Asp 122 (região 28); Asn 101 (região 25); Asn 33 (região 27). No entanto, a Gly 59 (região 29) é o único aminoácido que possui alta acessibilidade a nanopartícula que se encontra próximo ao sítio catalítico, contribuindo com uma interação que pode ocasionar modificações conformacionais da enzima, levando a uma diminuição da sua atividade hidrolítica. Ainda assim, a hipótese que o processo adsortivo nesse pH apresentou os melhores resultados devido ao Asp 122 e Asp 5 serem os maiores contribuintes energéticos para regiões de potencial eletrostático negativo da enzima (figura 16b), destacando as regiões 28 e 37 como os principais pontos de interação entre a enzima e as nanopartículas é suportado pelas evidências experimentais, lembrando que o ponto isoelétrico do aspartato é 2,77, conferindo uma carga negativa a essa espécie em pH 4,0 (NELSON; COX, 2009).

Em pH 4,6, o tamanho da área superficial das regiões hidrofóbicas, e das regiões positivas e negativas são diminuídas em relação ao observado em pH 4,0, devido a aproximação do valor de pH com o ponto isoelétrico da enzima. As NPM permanecem com carga positiva em torno de + 19,0 mV, enquanto que, a TLL se encontra com carga superficial global de - 2,0 mV. Dessa forma, observa-se na figura 20 que os aminoácidos Asp 130 e Glu 129 (região 25) e o Glu 210 (região 42) estão no lado frontal ao sítio catalítico da enzima, apresentando uma acessibilidade para interação inferior ao que foi estabelecido nas demais análises, entre 45,0% e 49,9%, porém, a contribuição energética fornecida pelos cálculos computacionais para o potencial eletrostático da enzima nessas regiões foi significativo, superando a ordem dos 75 Kcal.mol⁻¹,

Figura 20- Potencial eletrostático da TLL em pH 4,6. Em (a) lado frontal ao sítio catalítico; em (b) lado oposto ao sítio catalítico. As manchas azuis representam as regiões positivas, as vermelhas, as regiões negativas e as manchas em verde representam as regiões hidrofóbicas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Paralelamente, no lado oposto ao sítio catalítico, o Asp 165 (região 35), o Asp 122 (região 29), o Glu 87 e Asp 57 (ambos na região 30) possuem acessibilidade superior a 50%, são os maiores contribuintes energéticos e não possuem regiões positivas próximas que possam interferir nas suas contribuições para o potencial eletrostático da enzima. Essa condição já não ocorre nas regiões 39, 41 e 44, que também possuem carga negativa com contribuição energética acima de 60 Kcal.mol^{-1} e acessibilidade considerável, entretanto, que estão próximas a regiões positivas que podem influenciar na interação da enzima com as NPM.

A região 39 (negativa) se encontra próxima a região 10 (positiva) que contém uma grande quantidade de Arg com acessibilidade entre 35,0% e 50,0%, porém com altas contribuições energéticas, impedindo a interação dessa região com as NPM devido ao processo de repulsão de cargas. Já as regiões 41 e 44 (ambas negativas) estão ao lado da região 20 (positiva), composta por vários aminoácidos com acessibilidade entre 35,0 % e 50,0%, porém com grandes contribuições energéticas, que somadas, superam a contribuição das regiões negativas descritas.

Assim, uma possível explicação para a diminuição da atividade hidrolítica da enzima nesse pH, quando comparado com o pH 4,0, está no fato que a proximidade de regiões positivas no lado oposto da enzima ocasionar repulsão entre as espécies, em função das NPM estarem com carga positiva, levando a uma migração das possíveis interações para o lado frontal da enzima. Essas ligações deslocadas para as imediações do sítio catalítico modificaram a estrutura conformacional da enzima diminuindo o acesso do substrato ao sítio catalítico da enzima.

Por fim, em pH 8,0 as NPM se encontram com carga negativa e a região da TLL próxima ao sítio catalítico não modifica significativamente em relação a sua região hidrofóbica e positiva (figura 17). Os aminoácidos que apresentam carga positiva com maior acessibilidade para o meio externo estão no lado oposto da enzima (figura 18a). São eles: Gly 161 (região 7); Gly 163 (região 7); Gly 106 (região 13); Gly 240 (região 9); Thr 189 (região 11); Ser 105 (região 13); Asn 101 (região 9); Ser 3 (região 19). O aminoácido Gly 59 (região 2) é o único aminoácido de maior acessibilidade que se encontra próximo ao sítio catalítico da TLL.

As principais contribuições para uma região de potencial eletrostático positivo na enzima foram o Ser 3, Asn 101 e Ser 105 (figura 18b). Contudo, mesmo com os aminoácidos mais susceptíveis a interação estando do lado oposto ao sítio catalítico da enzima, supomos que a atividade hidrolítica recuperada foi baixa devido a contribuição energética de aminoácidos negativos como: Asp 165 (região 33), que exerce uma forte contribuição energética e está no centro do lado oposto da enzima, do Asp 122 (região 28) e Asp 5 (região 38), é maior do que as contribuições positivas, o que favorece uma grande repulsão das NPM, dificultando o processo de imobilização em condições que preservem a conformação do sítio catalítico. Outro aspecto que dificulta o processo de imobilização em pH 8,0 é a localização do aminoácido Asp 5 (região 38), que se encontra próximo ao Ser 3 (região 19), principal contribuinte da região positiva da enzima, levando a uma diminuição drástica na interação entre a superfície da TLL e as NPM.

Para determinar a quantidade de enzima adsorvida na superfície das nanopartículas foram utilizados dois métodos comparativos: o método de Bradford, que se baseia no princípio da ligação proteína–corante (BRADFORD, 1976) e o método por espectroscopia de fluorescência, que é baseado na fluorescência intrínseca das macromoléculas biológicas.

Os resultados referentes ao teor de proteína no sobrenadante do material imobilizado são apresentados na tabela 4. Observa-se nessa tabela que os sobrenadantes em pH 4,0 e 4,6 não apresentaram absorvância acima do ruído experimental para detecção pelo método de Bradford permitindo inferir que o processo de adsorção nesses pHs se mostrou mais eficiente do que em pH 8,0, no qual, aproximadamente 39,8% da enzima ficou retida no sobrenadante, não aderindo a superfície das nanopartículas. Já pela técnica de fluorescência foi observado que uma pequena quantidade de enzima se manteve presente nos sobrenadantes em pH 4,0 e 4,6, mostrando que no processo de imobilização 99,49 % da enzima TLL foi adsorvida a superfície das NPM em pH 4,0 e 97,75 % em pH 4,6. Em pH 8,0, 76% da enzima utilizada no processo de imobilização permaneceu no sobrenadante e apenas 24 % da enzima TLL foi adsorvida a NPM.

Tabela 4- Análise do teor de proteína no sobrenadante do processo de imobilização por diferentes métodos.

Amostra	Concentração de TLL por Bradford ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Concentração de TLL por Fluorescência ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
TLL ofertada inicialmente	14,63 (100 %)	9,77 (100 %)
S. NPM@TLL pH 4,0	0,00 (0,0 %)	0,05 (0,51 %)
S. NPM@TLL pH 4,6	0,00 (0,0 %)	0,22 (2,25 %)
S. NPM@TLL pH 8,0	5,83 (39,8 %)	7,43 (76,0 %)

*S. NPM@TLL, remete ao sobrenadante do material imobilizado.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Como a interação entre enzima e suporte pode ocorrer através de interações mais fracas que favorecem a dessorção da enzima imobilizada na superfície das nanopartículas, foi analisado o processo de dessorção mecânica do material sintetizado quando exposto a uma lavadora ultrassônica por 5 ciclos de 5 minutos cada e monitoradas por espectroscopia de UV-VIS a partir do método de Bradford e por espectroscopia de fluorescência.

Os resultados obtidos para os estudos dessorativos mostraram pelas técnicas analisadas que após 5 ciclos de lavagem não foi possível determinar a taxa de dessorção, devido aos valores de dessorção obtidos serem inferiores aos limites de

detecção da curva de calibração do método de Bradford (2 mg.mL^{-1}) e da fluorescência ($0,4 \text{ mg.mL}^{-1}$).

A baixa taxa de dessorção observada experimentalmente pode ser atribuída à ocorrência de interações NPM - TLL mais fortes, talvez de caráter iônico, conforme a hipótese inicial levantada no planejamento do processo de adsorção. As adsorções iônicas ocorrem da mesma maneira que a adsorção física, entretanto, são interações mais energéticas do que as forças de Van der Waals ou ligação de hidrogênio, porém mais fracas que as ligações covalentes que caracterizam a adsorção química. Dado o caráter iônico e as condições amenas de imobilização, nesse tipo de adsorção ocorrem pequenas modificações estruturais na enzima, propiciando a obtenção de biocatalisadores com atividades enzimáticas comparáveis a outros biocatalisadores obtidos por ligações covalentes (VIEIRA, 2009).

Dessa forma, as condições experimentais referentes a atividade enzimática e o teor de proteína do biocatalisador que apresentou a melhor adsorção (NPM@TLL pH 4,0) foi usado na determinação da interação entre o suporte e a enzima por espectroscopia de fluorescência. Essa técnica se mostra eficiente para caracterização de proteínas devido à presença de fluoróforos intrínsecos na constituição dessas macromoléculas. As proteínas apresentam apenas três tipos de fluoróforos: triptofano, tirosina e fenilalanina. Experimentalmente, a fluorescência do triptofano é a mais usualmente estudada por apresentar um maior rendimento quântico (razão entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos) do que a fenilalanina e a tirosina (LAKOWICZ, 2006). Portanto, a caracterização do material imobilizado (NPM@TLL) por fluorescência foi viabilizado devido a lipase *Thermomyces lanuginosus* (TLL) possuir 4 resíduos de triptofano em sua estrutura primária.

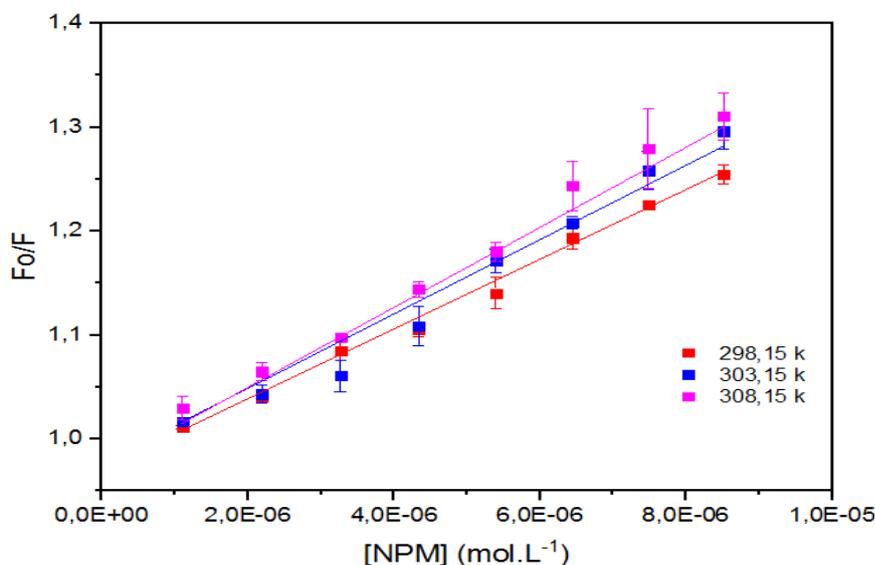
A partir dos fenômenos de supressão da fluorescência foi possível obter informações sobre os tipos de interação entre a enzima (fluoróforo) e as nanopartículas (supressor), e conseqüentemente, os parâmetros termodinâmicos da interação. O mecanismo de supressão da intensidade de fluorescência foi avaliado a partir da equação de Stern Volmer, apresentada na equação 8.

$$\frac{F_0}{F} = k_q \cdot \tau_0 \cdot [Q] = 1 + k_{sv} \cdot [Q] \quad (\text{equação 8})$$

Nesta equação, F_0 e F são as intensidades de fluorescência da proteína na ausência e na presença de ligante, respectivamente, $[Q]$ é a concentração do ligante, k_q é a constante da interação bimolecular, τ_0 é o tempo de vida do fluoróforo na ausência do ligante (τ_0 da ordem de $5 \cdot 10^{-9}$ s) e a constante de interação de Stern-Volmer será k_{sv} . Em experimentos de interação ligante-macromolécula, o valor de k_{sv} é comumente considerado como a constante de ligação do complexo (k_b) (OLIVEIRA, 2017).

O valor da constante de ligação (k_b) foi determinado pela regressão, por meio de um gráfico de F_0/F versus $[Q]$, em que F e F_0 são respectivamente, a intensidade de fluorescência da TLL na presença das diferentes concentrações de nanopartículas e intensidade de fluorescência da enzima pura, $[Q]$ é a concentração do supressor, em que, o valor da constante é igual ao valor do coeficiente angular, conforme apresentado na figura 21.

Figura 21- Gráfico de Stern Volmer para a supressão da intensidade de fluorescência da TLL em diferentes temperaturas na presença de diferentes concentrações de NPM .



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os estudos de fluorescência em diferentes temperaturas permitiram calcular os parâmetros termodinâmicos envolvidos na interação das NPM com a enzima TLL (figura 22), onde o coeficiente angular corresponde a $-\frac{\Delta H}{R}$ e o coeficiente linear a $\frac{\Delta S}{R}$. De acordo com Ross e Subramanian (1981), é possível descrever a espontaneidade do processo e inferir a natureza das ligações que propiciaram a interação dos materiais.

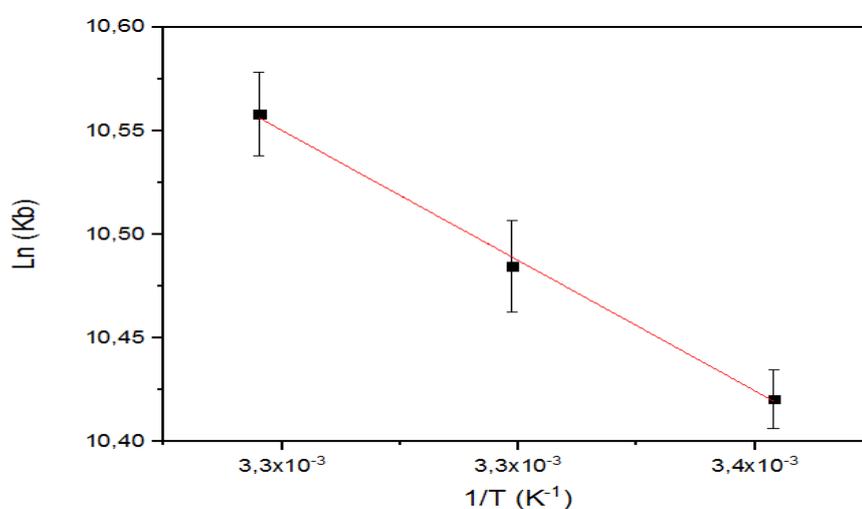
Os valores da variação entálpica (ΔH) e da variação entrópica (ΔS) envolvidas na interação foram calculados a partir da equação de Van't Hoff (equação 9) e a variação da energia livre de Gibbs (ΔG) foi calculada a partir da equação 10.

$$\ln k_b = - (\Delta H/RT) + (\Delta S/R) \quad (\text{equação 9})$$

$$\Delta G^\circ = - RT \cdot \ln k_b \quad (\text{equação 10})$$

Em ambas as equações, k_b é a constante de ligação, $R = 8,314 \text{ J.mol}^{-1}.\text{K}^{-1}$ e T é a temperatura em Kelvin

Figura 22 – Dependência da constante de ligação (k_b) com a temperatura.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os valores dos parâmetros termodinâmicos obtidos estão apresentados na tabela 5 Segundo a literatura, o valor positivo de ΔS , pode indicar uma mudança parcial na estrutura do solvente, pela exclusão de moléculas de água próximas a região do sítio catalítico da enzima, que juntamente com valores positivos de ΔH indicam que a interação das NPM com a TLL é espontânea, em torno de $-26,4 \text{ KJ.mol}^{-1}$, e que a sua interação é determinada por ligações eletrostáticas de caráter iônico (ROSS; SUBRAMANIAN, 1981).

Tabela 5- Valores dos parâmetros termodinâmicos associados a interação das NPM com a enzima TLL em diferentes temperaturas.

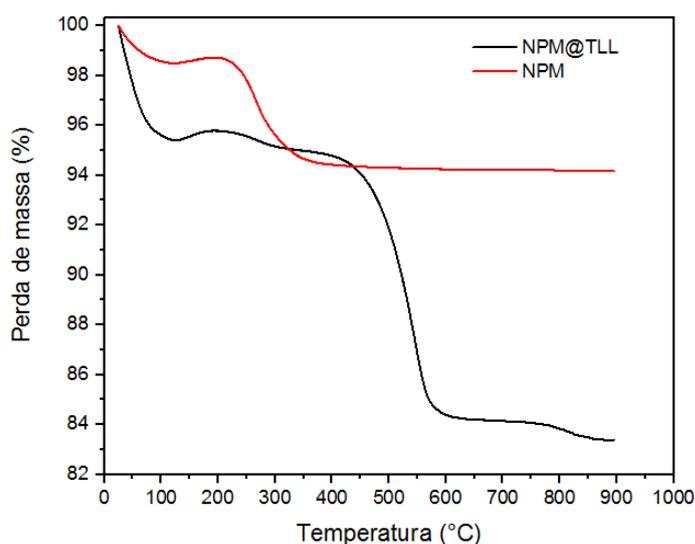
Temperatura (K)	$\Delta H \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{)}$	$\Delta S \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{K}^{-1}\text{)}$	$\Delta G \text{ (KJ.mol}^{-1}\text{)}$
298,15			-25,8
303,15	10,44	0,122	-26,4
308,15			-27,0

Fonte: Elaborado pelo autor.

De forma semelhante, as NPM@TLL pH 4,0 foram utilizadas na caracterização do material imobilizado pelas técnicas de análise termogravimétricas (TGA), microscopia de força atômica (AFM), espalhamento dinâmico de luz (DLS) e estabilidade operacional do biocatalisador.

Os resultados da análise térmica obtida para as nanopartículas magnéticas (NPM) e para o material resultante do processo de imobilização (NPM@TLL) estão representados pela figura 23.

Figura 23 - Curvas termogravimétricas antes e depois da incorporação da enzima TLL na superfície das NPM.

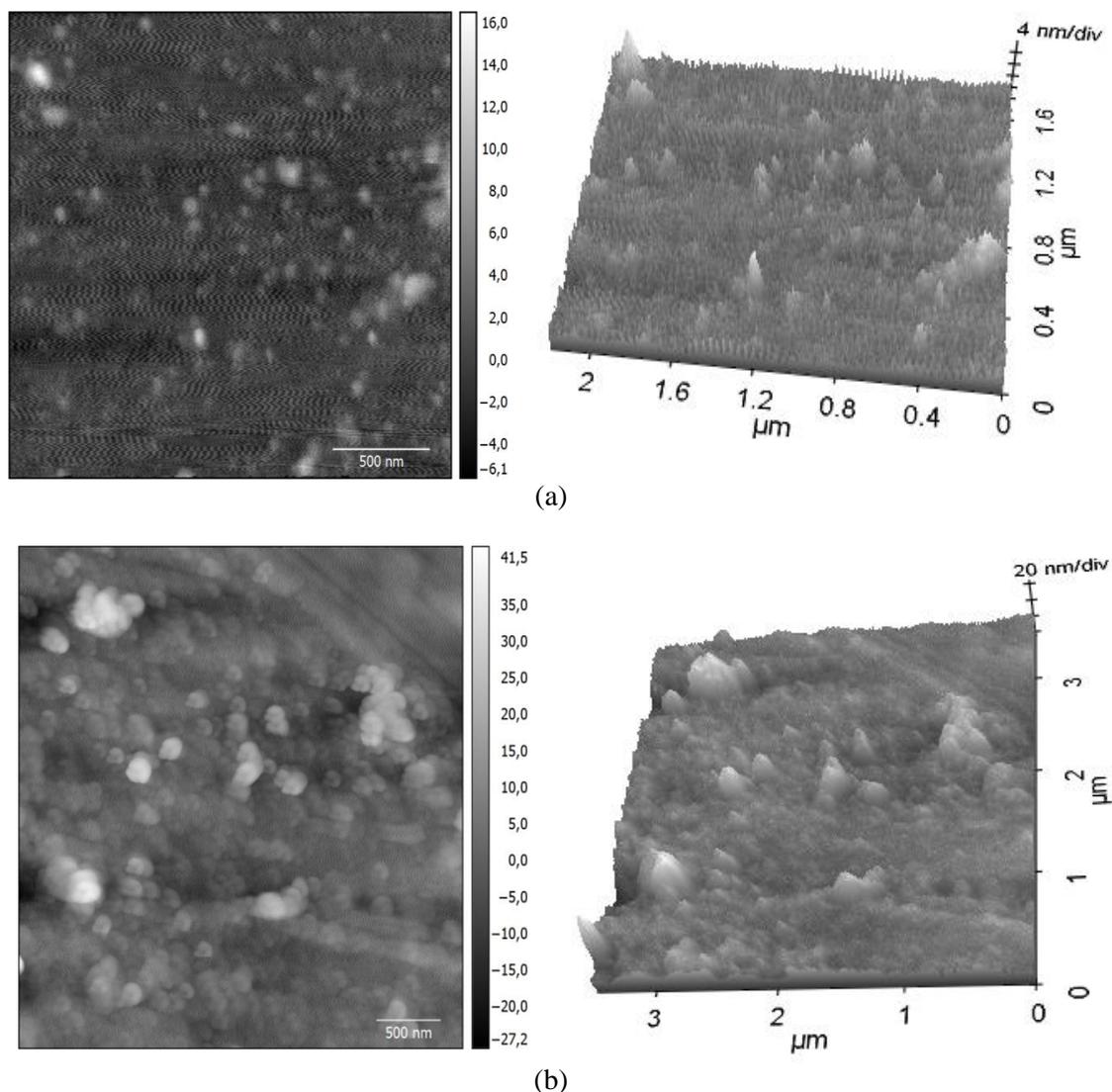


Fonte: Elaborado pelo autor.

As NPM apresentaram uma perda de massa de aproximadamente 5,5 % em decorrência da eliminação de água e de possíveis impurezas do material. Entretanto, observa-se ganho de massa de aproximadamente 3,1% (0,16 mg) no intervalo de 150°C a 320°C em decorrência de grupos hidroxilas residuais que ainda permanecem na superfície das NPM mesmo após o processo de lavagem e armazenamento do material sintetizado. Isso ocorre devido a dificuldade no processo de lavagem das nanopartículas, de modo a alcançar um pH totalmente neutro. Já as NPM@TLL apresentaram uma perda significativa de massa (15,9 %), quando comparado com a NPM, confirmando a existência da enzima TLL na superfície da nanopartícula magnéticas.

A análise das imagens obtidas por AFM na figura 24 (A) indica que as NPM possuem uma morfologia esférica e um diâmetro de aproximadamente 12 nm. Enquanto que, a topografia das NPM@TLL na figura 24 (B) manteve a morfologia esférica, entretanto, com um diâmetro de aproximadamente 40 nm.

Figura 24 – Imagens topográficas bidimensional e tridimensional do AFM no modo não contato das nanopartículas magnéticas (a); e do material imobilizado (NPM@TLL) (b).



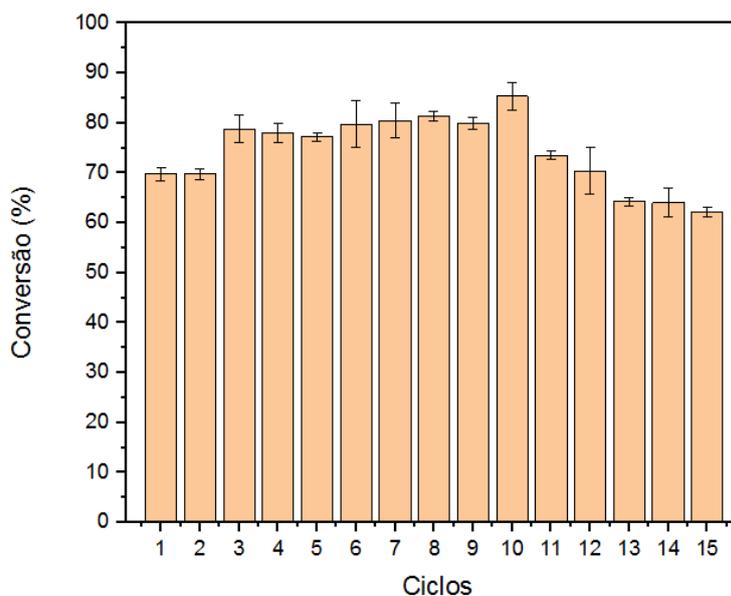
Fonte: Elaborado pelo autor.

Esse aumento de tamanho confirma que a enzima TLL está adsorvida na superfície das nanopartículas aumentando em 4 vezes o seu diâmetro. As medidas dessas mesmas nanopartículas pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) mostraram que as NPM possuem uma distribuição monodispersa de tamanho, com um diâmetro hidrodinâmico (D_H) de $34,19 \pm 0,91$ nm e um índice de polidispersão (PDI) de $0,182 \pm 0,03$. Para as NPM@TLL o diâmetro hidrodinâmico médio encontrado foi de $81,82 \pm 7,5$ nm e um PDI de $0,153 \pm 0,119$. Assim, a técnica de DLS também parece indicar a existência de enzimas na superfície do suporte, sendo que, o aumento do

diâmetro das NPM e das NPM@TLL em relação as demais técnicas de caracterização (TEM e AFM) é justificada pela existência de um raio de hidratação, por se tratar de superfícies hidrofílicas.

E na perspectiva que a reutilização de biocatalisadores é importante em função do alto custo das enzimas e sua possível contaminação no final do processo, foi verificado a eficiência e a capacidade de reutilização das NPM@TLL em processos catalíticos envolvendo reações de esterificação. De acordo com os resultados apresentados na figura 25, o processo foi catalisado com uma eficiência de aproximadamente 80% durante 12 ciclos de reutilização, porém, o biocatalisador ainda permaneceu com uma eficiência de aproximadamente 65% até o 15º ciclo estudado.

Figura 25- Estabilidade operacional do biocatalisador (NPM@TLL) após sucessivos ciclos de síntese de oleato de decila.



Fonte: Elaborado pelo autor.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho verificamos que a síntese realizada para obtenção de nanopartículas magnéticas se mostrou adequada, uma vez que, a presença do agente redutor e atmosfera inerte resultaram na formação de partículas com tamanho e forma uniformes. A caracterização morfológica das nanopartículas, usando a técnica de TEM, mostrou que a amostra via coprecipitação possui um diâmetro médio de aproximadamente 8,3 nm. A imobilização da enzima TLL em nanopartículas por adsorção física, a partir da modificação das cargas de superfície, se mostrou mais efetivo em pH 4,0. Nesse pH, a atividade enzimática recuperada foi de 62,3% em relação a atividade enzimática da lipase livre, o processo de adsorção reteve 99,49% das enzimas na superfície das nanopartículas; o processo de dessorção da enzima se mostrou inferior aos limites estabelecidos pelos métodos de Bradford e por fluorescência após 5 ciclos de lavagem e a eficiência catalítica do material imobilizado obteve aproximadamente 80 % de conversão na síntese de oleato de etila por 12 ciclos de reação. A elucidação da orientação, na qual a interação enzima/nanopartícula está ocorrendo no sistema, foi descrita pelas equações de Stern Volmer e Van't Hoff, observando-se a ocorrência de interações iônicas em função da diferença de carga entre a nanopartícula e a enzima TLL, baseado nos parâmetros termodinâmicos encontrados: $\Delta G^\circ = - 25,8 \text{ KJ.mol}^{-1}$, $\Delta H^\circ = 10,44 \text{ KJ.mol}^{-1}$, $\Delta S^\circ = 0,122 \text{ KJ.mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$.

Nessa perspectiva, a hipótese inicialmente levantada se mostrou consistente com os dados experimentais obtidos de que as interações ocorrem preferencialmente no lado oposto ao sítio catalítico da enzima, que possui uma grande concentração de resíduos de aminoácidos com cargas negativas e também apresenta os aminoácidos ASP 122 e ASP 5, que são os maiores contribuintes para o potencial eletrostático da TLL. Assim, o presente estudo demonstra a possibilidade de desenvolvimento de novos biocatalisadores eficientes e mais econômicos a partir de interações que levem em consideração a diferença de cargas entre enzimas e seus suportes.

REFERÊNCIAS

- APEEL, C.; MA, L. Q.; RHUEL, R. D. Point zero charge determination in soils and minerals via traditional methods and detection of electroacoustic mobility. **Geoderma**, v.113, p. 77–93, 2003.
- ATACAN K., ÖZACAR M. Characterization and immobilization of trypsin on tannic acid modified Fe₃O₄ nanoparticles. **Colloids And Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 227–236, 2015.
- ATKINS, P.; PAULA, J. **Físico – Química**. Rio de Janeiro: LTC, 2008. 428 p.
- BALL, P. Water as an active constituent in cell biology. **Chemical Reviews**. n. 108, p. 74–108, 2008.
- BAR-ELI, A.; KATCHALSKI, E. A water insoluble trypsin derivate and its use as a trypsin column. **Nature**, n.188, p. 856-857, 1960.
- BASILIO, C. A. **Extração, purificação, imobilização, estudo cinético e calorimétrico das enzimas proteolíticas presentes no látex do mamoeiro**. 1994. 128 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1994.
- BCC RESEARCH. **Global Markets for Enzyme in Industrial Applications**. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/report/BIO030j.html>. Acesso em: 17/07/2019.
- BI, Y. et al. Biosynthesis of oleyl oleate in solvent free system by *Cândida rugosa* lipase (CRL) immobilized in macroporous resin with crosslinking of aldehyde dextran. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.133, p. 1–5, 2016.
- BIEDERMANNNOVA, L; SCHNEIDER, B. Hydration of proteins and nucleic acids: advances in experiment and theory. A review. **Biochimica et Biophysica Acta**, n.1860, p. 1821–1835, 2016.
- BINI, R. D. **Desenvolvimento de nanopartículas de magnetita para aplicações biológicas: propriedades estruturais, microestruturais e magnéticas**. 2016. 73 f. Dissertação (Mestrado em Física) – Departamento de Física, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2016.
- BONIFÁCIO, P. L. **Equilíbrio líquido – líquido e estudos das forças motrizes de partição de íons em novos sistemas aquosos bifásicos baseados em líquidos iônicos**. 2019. 92 f. Texto de Qualificação (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2019.
- BORKAR, P. S. Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain – *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.40, p.358–366, 2009.

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

BRAVO, L. F. R. **Influência do tempo e da temperatura na oxidação dos açúcares SAE 1020 e SAE 304**. 2017. 11 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Engenharia Mecânica) – Departamento de Engenharia Mecânica, Universidade do Rio Verde, 2017.

CABRAL, J. M. S.; GAMA, M.; AIRES-BARROS, M. R. **Engenharia enzimática**. Lisboa: LIDEL, 2003. v.1, p. 1–11.

CARLSON, J. J. Review of PZC and IEP for iron ores. **Mineral Processing and Extractive Metallurgy Review**. (Chemistry – Surfactants Series). New York: Marcel Dekker, 2010. v.37, p.407–447.

CARRIJO, L. C.; MARTINS, M. L. B. Enovelamento de Proteínas. In: BARACAT – PEREIRA, M. C. (Ed.). **Bioquímica de proteínas: fundamentos estruturais e funcionais**. Viçosa: Ed. UFV, 2014. v.1, p. 41–63.

CARRIJO, L. C.; BARACAT-PEREIRA, M. C. A bioquímica de proteínas. In: BARACAT – PEREIRA, M. C. (Ed.). **Bioquímica de proteínas: fundamentos estruturais e funcionais**. Viçosa: Ed. UFV, 2014. v.1, p. 19–40.

CHIBATA, I.; TOSA, T. Industrial applications of immobilized enzymes and immobilized microbial cells. In: WINGRAD, L. B.; KATCHALSKI-KATZIR, E.; GOLSMITH, L. **Applied Biochemistry Bioengineering**. 1. ed. London: Academic Press; 1976. p. 239-360.

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

DALLA – VECCHIA, R; NASCIMENTO, M. G; SOLDI, V. Aplicações sintéticas de lipases imobilizadas em polímeros. **Química Nova**, v.27, p. 623–630, 2004.

DE CASTRO, H. F. et al. Imobilização de enzimas e sua estabilização In: Enzimas **em Biotecnologia: Produção, aplicações e mercado**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008. cap. 6, p.123-150.

DEREWENDA, U.; SWENSON, L.; WEI, Y. Conformational lability of lipases observed in the absence of an oil-water interface: crystallographic studies of enzymes from the Fungi *Humicola Lanuginosa*, and *Rhizopus delemar*. **Journal of Lipid Research**, v. 35, n.1, p. 524–534, 1994.

DIAS, M. R. G. **Resolução de álcool alílicos catalisadas por diferentes lipases imobilizadas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas**. 2018. 131 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química e Biologia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

DIZGE, N; KESKINLER, B; TANRISEVEN, A. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrene-divinylbenzene copolymer. **Biochemistry Engineering Journal**, v.44, p.220–225, 2009.

ERDEMOĞLU, 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.

FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, M.; SANROMÁN, M. Á.; MOLDES, D. Recent developments and applications of immobilized laccase. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 8, p. 1808–1825, 2013.

FERNANDEZ – LAFUENTES, R. Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: uses and prospects as an industrial biocatalyst. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.62, p. 197 – 212, 2010.

FERRAZ, J. L. A. A. et al. Obtaining of microbial lipase: a brief review. **Revista Ciências exatas e naturais**, v.20, n.1, p. 30–54, 2018.

FERREIRA, M. M. et al. Different strategies to immobilize lipase from *Geotrichum candidum*: kinetic and thermodynamic studies. **Process Biochemistry**, v. 67, p. 55–63, 2018.

FIGUEROLA, A. et al. From iron oxides nanoparticles towards advanced iron-based inorganic materials designed for biomedical applications. **Pharmacological Research**, v.62, p. 126-143, 2009.

GAO, Z. et al. Lipase immobilization on functionalized mesoporous TiO₂: specific adsorption, hyperactivation and application in cinnamyl acetate synthesis. **Process Biochemistry**, v. 64, p. 152–159, 2018

GAO, J. et al. Monodisperse core shell magnetic organosilica nanoflowers with radial wrinkle for lipase immobilization. **Chemical Engineering Journal**, v.309, p. 70–79, 2017.

GRUBNOFER, N.; SCHLEITH, L. Modifizierte Ionenaustauscher als spezifische Adsorbentien. **Naturwissenschaften**, v.40, n. 19, 1953.

GUISAN, J. M. Immobilization of enzyme as the 21st century begins. In: GUISAN, J. M (Ed.). **Immobilization of Enzymes and Cells**. Totowa: Humana Press, 2006. v.1, p. 1–13.

GUO Z., SUN Y. Characteristics of imobilized lipase on hydrofobic superparamagnetic microspheres to catalyze esterefication. **Biotechnology Progress**, v. 20,n. 2, p. 500–506, 2004.

HAJAR, M; VAHABZADEH, F. Biolubricant production from castor oil in a magnetically stabilized fluidized bed reactor using lipase immobilized on Fe₃O₄ nanoparticles. **Industrial Crops and Products**, v.94, p. 544–556, 2016.

HASAN, F.; SHAH, A. A.; HAMEED, A. Industrial applications of microbial lipases. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 39, n. 2, p. 235-251, 2006.

HENRIQUES, R. O. **Desenvolvimento de metodologias para a imobilização e coimobilização de enzimas em nanopartículas magnéticas**. 2016. 175 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

HOLA K. et al. Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances. **Biotechnology Advances**, v. 33,n.1, p. 1162–1176, 2015.

HOSSEINI, S. M. et al. Lipase immobilized chitosan crosslinked magnetic nanoparticles as a biocatalyst for ring opening esterification of itaconic anhydride. **Biochemical Engineering Journal**, v. 143, p. 141–150, 2019.

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

JEONG, U. et al. Superparamagnetic colloids: controlled synthesis and niche applications. **Advanced Materials**, v. 19, n.28, p. 33–60, 2007.

JHA,B. K. et al. Titration microcalorimetry studies of the interaction between *Humicola lanuginosa* lipase and ionic surfactants. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.213, p.262-264, 1999.

JIANG, Y. et al. Virus – like organosilica nanoparticles for lipase immobilization: characterization and biocatalytic applications. **Biochemical Engineering Journal**, v. 144, p. 125–134, 2019.

JIMENEZ,R. S.; BOSCO, S. M.; CARVALHO, W. A. Remoção de metais pesados de efluentes aquosos pela zeólita natural escolécita – influência da temperatura e do pH na adsorção em sistemas monoelementares. **Química Nova**, v.27, n.5, p. 734–738, 2004.

KARSHIKOFF, A. Non-covalent interactions in proteins. California: Imperial College Press. 2006, 333 p.

KHAN, F. I. et al. The lid domain in lipases: structural and functional determinant of enzymatic properties. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 5, 2017.

KHOABI, M. et al. Polyethyleneimine – modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles for lipase immobilization: characterization and application. **Materials Chemistry and Physics**, v.149 -150, p. 77-86, 2015.

KIM, Y. IL; KIM, D.; LEE, C. S. Synthesis and characterization of CoFe₂O₄ magnetic nanoparticles prepared by temperature-controlled coprecipitation method. **Physica B: Condensed Matter**, v. 337, n. 1, p. 42–51, 2003.

KRAJEWSKA, B. Application of chitin and chitosan based materials for enzyme immobilizations: a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v.35, p.126–39, 2004.

KUMAR, G. et al. Immobilization of high catalytic acid protease on functionalized mesoporous activated carbon particles. **Biochemical Engineering Journal**, v. 43, 2009.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. 3 ed. University of Maryland Baltimore, Maryland, USA, 2006.

LESK, A. M. **Introduction to protein science: architecture, function and genomics**. New York: Oxford University Press, 2004. 326 p.

LI, K. et al. Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of Burkholderia cepacia lipase via immobilization on melamine glutaraldehyde dendrimer modified magnetic nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, v. 351, p. 258–268, 2018.

LI, P. et al. Lipase immobilized on rosin based functional polymers as a biocatalyst for the synthesis of ethyl dodecanoate. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.133, p. S106–S113, 2016.

LIN M. M. et al. Development of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONS) For Translation Clinical Applications. **IEEE Transactions Nanobioscience**, v. 7, n. 4, p. 298-305, 2008.

LIN, Y; CHEN, Z; LIU, X. Y. Using inorganic nanomaterials to endow biocatalytic systems with unique features. **Trends in Biotechnology**, v.34, n.4, p. 303–315, 2016.

MALDONADO, R. R. et al. Evaluation of partial purification and immobilization of lipase from *Geotrichum candidum*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.4, n.3, p.321-326, 2015.

MARKETS AND MARKETS. **Lipase market worth \$ 590,5 million by 2020**. 2015. Disponível em: <http://www.marketsandmarkets.com/PressReleases/lipase.asp>. Acesso em: 17 jul. 2019.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Química Nova**, v.35, n.7, p. 1434–1446, 2012.

MÁRQUEZ, F. et al. Synthesis and characterization of monodisperse magnetite hollow microspheres. **Soft Nanoscience Letters**, v. 1, n. 2, p. 25–32, 2011.

MATEO, C. et al. Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. **Enzyme and Microbial Technology**, v.4. p. 1451–1463, 2007.

MATEO, C. et al. Advances in the design of new epoxy supports for enzyme immobilization stabilization. **Biochemical Society Transactions**, v. 35, n. 6, p. 1593–1601, 2007.

MEDEIROS, E. S; MATTOSO, L. H. C. Nanotecnologia. In: **Nanotecnologia; introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2012. v.1,p.13–29.

MENDES A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831–840, 2011.

MIAO, C. et al. Lipase immobilization on amino silane modified superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles as biocatalyst for biodiesel production. **Fuel**, v. 224, p. 774 – 782, 2018.

MIGUEZ, J. P. et al. Enzymatic synthesis optimization of a cosmetic ester catalyzed by a homemade biocatalyst prepared via physical adsorption of lipase on amino-functionalized rice husk silica. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 139, p. 296–308, 2018.

MIRANDA, J. S. et al. Immobilization of *Thermomyces lanuginosus* Lipase on mesoporous polyhydroxybutyrate particles and application in alkyl esters synthesis: Isotherm, Thermodynamic and Mass transfer studies. **Chemical Engineering Journal** 251, p.392-403, 2014.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger principles of biochemistry**. 5 ed. New York: W.H. Freeman & Co, 2009.

NELSON, J. M.; GRIFFIN, E. G. Adsorption of invertase. **Journal American Chemical Society**, n.38, p. 1109–1115, 1916.

OLIVEIRA, G. A. V. **Equilíbrio químico e cinética enzimática da interação de alfa amilase com compostos fenólicos encontrados na cerveja**. 2017. 68 f. Dissertação (Mestrado em Físico - Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2017.

PACE, C. N.; SCHOLTZ, J. M.; GRIMSLEY, G. R. Forces stabilizing proteins. **FEBS Letters**, p. 2177–22184, 2014.

PARK, H. J. et al. Synthesis and characterization of enzyme-magnetic nanoparticle complexes: Effect of size on activity and recovery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 83, n. 2, p. 198–203, 2011.

PATEL, V. et al. Synthesis of ethyl caprylate in organic media using *Cândida rugosa* lipase immobilized on exfoliated graphene oxide: process parameters and reusability studies. **Biochemical Engineering Journal**, v. 95, n.15, p. 62–70, 2015.

PEREIRA, J. A. N. **Estudo da atividade, estabilidade e cinética enzimática da lacase em líquidos iônicos**. 2010. 82 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) – Departamento de Química, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2010.

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.

QUETTIER, A. L.; EASTMOND, P. J. Storage oil hydrolysis during early seedling growth. **Plant Physiology and Biochemistry**, v.47, n.6, p. 485–490, 2009.

QUINTANA, P.G. et al. Enzyme catalyzed preparation of chenodeoxycholic esters by an immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* lipase. **Journal Molecular Catalysis B: enzymatic**, v. 118, p. 36–42, 2015.

RABE, M.; VERDES, D.; SEEGER, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.162, p. 87–106, 2011.

RĂCUCIU, M.; CREANGĂ, D. E.; AIRINEI, A. Citric-acid-coated magnetite nanoparticles for biological applications. **European Physical Journal E**, v. 21, n. 2, p. 117–121, 2006.

RAM, S.S. Industrial Biotechnology: an overview. In: **Advances in Industrial Biotechnology**. New Delhi: I.K International Publishing House, 2013. v.1, p. 1 – 35.

REICHARDT, C. Highly stable adsorptive and covalent immobilization of *Thermomyces lanuginosus* lipase on tailor made porous carbon material. **Biochemical Engineering Journal**, v. 138, p. 63–73, 2018.

REIS, P. et al. Lipases at interfaces: a review. **Advances in Colloid and Interface Science**, v.147, p. 237–250, 2009.

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.

ROBINSON P. J; DUNNILL P.; LILLY M. D. The properties of magnetic supports in relation to immobilized enzyme reactors. **Biotechnology and Bioengineering**. v. 15, n.3, p. 603–606, 1973.

ROCHA, W. R. Interações intermoleculares. **Química Nova na Escola**, n.4, p. 31–36, 2001.

ROLLETT, A. et al. Covalent immobilization of protease and lactase substrates onto siloxanes. **Chemosphere**, v. 80, n.8, 2010.

ROSS, P. D.; SUBRAMANIAN, S. Thermodynamics of protein association reactions: forces contributing to stability. **Biochemistry, ACS Publications**, v. 20, n. 11, p. 3096–3102, 1981.

RUEDA, N. et al. Chemical amination of lipase improves their immobilization on octyl glyoxyl agarose beads. **Catalysis Today**, v.259, p. 107–118, 2016.

SIKORA, A. et al. Enantioselective acetylation of (R,S) atenolol: the use of *Cândida rugosa* lipase immobilized onto magnetic chitosan nanoparticles in enzyme catalyzed biotransformation. **Journal of Molecular Catalysis B: enzymatic**, v.134, p. 43–50, 2016.

SILVA, M. F. **Estudo de estabilidade coloidal de sistemas de nanopartículas magnéticas recobertas visando aplicação em biomedicina**. 2017. 143 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São

Paulo, São Carlos, 2017.

SILVA, T. A. L. **Estudo da estabilidade da enzima bromelina extraída do curauá (*Ananas erectifolius* L.B.SMITH)**. 2012. 99 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2012.

SHARMA, R.; CHISTI, Y.; CHAND, U. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. **Biotechnology Advances**, v. 19, p. 627–662, 2001.

SHULTZ, M. J. et al. Water: a responsive small molecule. **Accounts of Chemical Research**, v.45, p. 15–22, 2011.

SOARES, C. M. F. et al. Characterization and Utilization of *Candida rugosa* Lipase Immobilized on controlled pore silica. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 77, p. 745–746, 1999.

SOUZA, A. T. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro para aplicações biomédicas – um estudo citotóxico em linhagem celular de carcinoma cervical humano (células HeLa)**. 2011. 111 f. Dissertação (Mestrado em Biofísica Molecular) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual “Júlio Mesquita Filho”, São José do Rio Pardo, 2011.

SOUZA, K. C. **Síntese e caracterização de nanopartículas e nanocompósitos magnéticos para aplicações biomédicas**. 2011. 232 f. Tese (Doutorado em ciências) – Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011.

SOUZA, L. T. A. et al. Imobilização enzimática: princípios fundamentais e tipos de suportes. In: **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. São Paulo: Blucher, 2017. v.4, p.529–568.

TAIPA, M. A.; GAMA, M. Estrutura e função das enzimas. In: **Engenharia enzimática**. Lisboa: LIDEL, 2003. v.1, p. 13–65.

TAKASABI, Y.; KOSUGI, Y.; KANBAYASHI, A. **Fermentation Advances**. Perlman D, New York: Academic Press; 1969.

TALBERT; J. N; GODDART, J. M. Enzyme of material surfaces. **Colloids and Surface B: Biointerfaces**, v.93, p. 8–19, 2012.

TAN, H.; FENG, W.; JI, P. Lipase immobilized on magnetic multi-walled carbon nanotubes. **Bioresource Technology**, v. 115, p. 172–176, 2012.

TANG, Z. X.; QIAN, J. Q.; SHI, L. E. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. **Materials Letters**, v. 61, n. 1, p. 37–40, 2007.

THAPA, D. et al. Properties of magnetite nanoparticles synthesized through a novel chemical route. **Materials Letters**, n. 58, p. 2692–2694, 2004.

VERWEY, E. J. W. Electronic conduction of magnetite (Fe_3O_4) and its transition point at low temperatures. **Nature**, v.144, n. 327, 1939.

VESCOVI, V. **Lipases imobilizadas em suportes híbridos como biocatalisadores para a produção de ésteres de açúcares**. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2016.

VIDAL, C. B. et al. Princípios Básicos. In: **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza:Imprensa Universitária, 2014. v.1,p. 13–22.

VIEIRA, D. C. **Imobilização da enzima β -galactosidase de *Kluyveromyces fragilis* em agarose e quitosana utilizando diferentes protocolos de ativação**. 2009. 115 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Departamento de Engenharia Química de São Carlos, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

WANG, X.Y. et al. Preparation Fe_3O_4 @chitosan magnetic particles for covalent immobilization of lipase from *Thermomyces lanuginosus*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.75, p. 44–50, 2015.

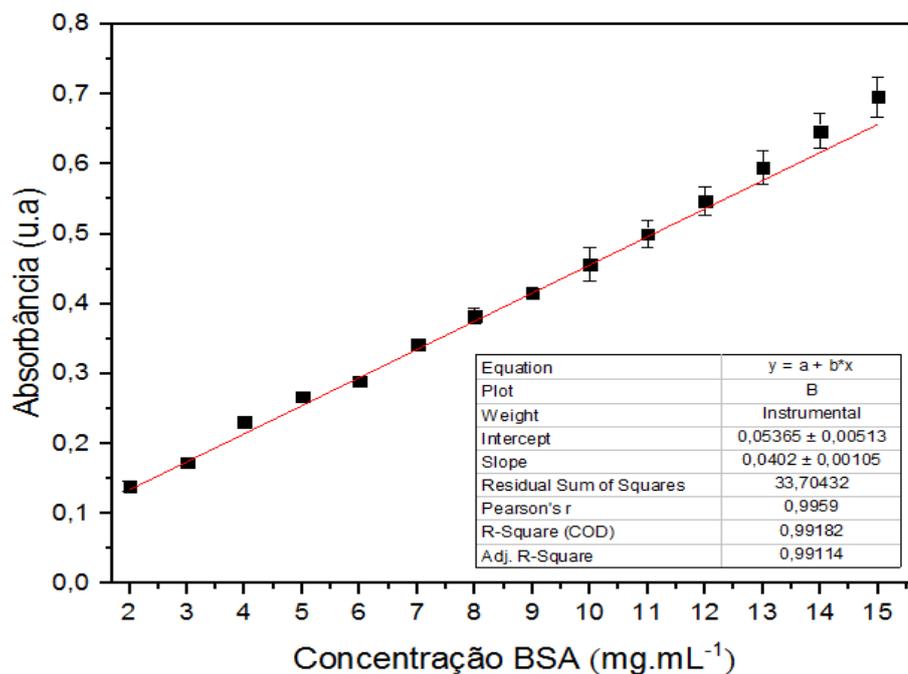
WU, C. et al. Active biocatalysts based on *Candida rugosa* lipase immobilized in vesicular silica. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 6, p. 953–959, 2012.

YANG, X. et al. Preparation of immobilized lipase on magnetic nanoparticles dialdehyde starch. **Carbohydrate Polymers**, v. 218, p. 324–332, 2019.

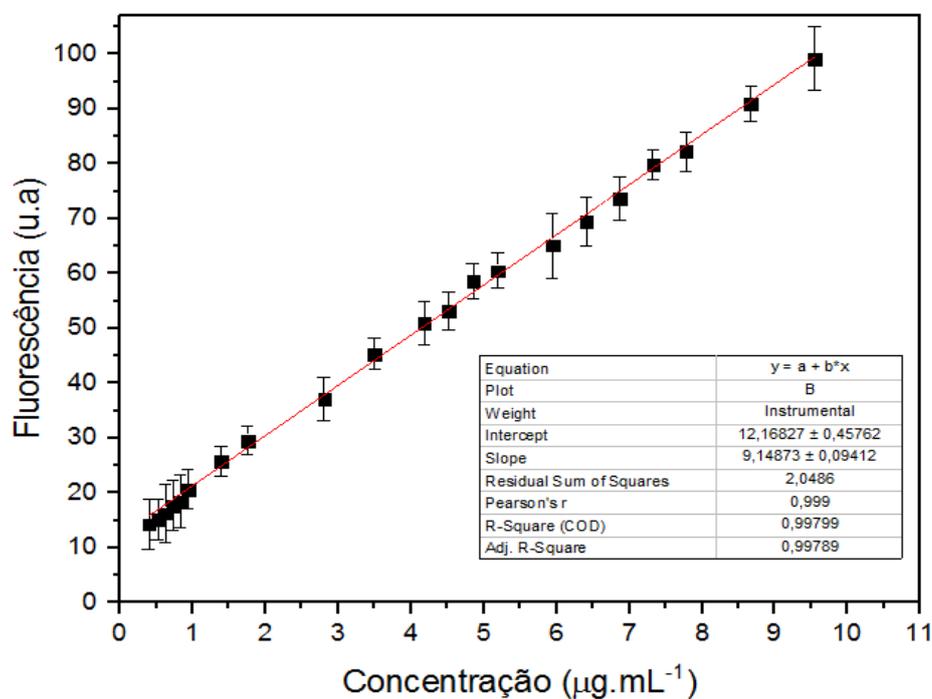
ZHANG; D. H. et al. Lipase immobilization on epoxy activated poly(vinyl acetate acrylamide) microspheres. **Colloids and Surfaces B: biointerfaces**, v.129, p. 206–210, 2015.

ZHOU, Z.et al. Immobilization of lipase in Cage type mesoporous organosilicas via covalent bonding and crosslinking. **Catalysis Today**, v. 243, p.173 – 183, 2015.

APÊNDICE A- Curvas de calibração da lipase *Thermomyces lanuginosus* por diferentes técnicas. Em (a) espectroscopia de UV-VIS, baseado no método de Bradford; em (b) espectroscopia de fluorescência.

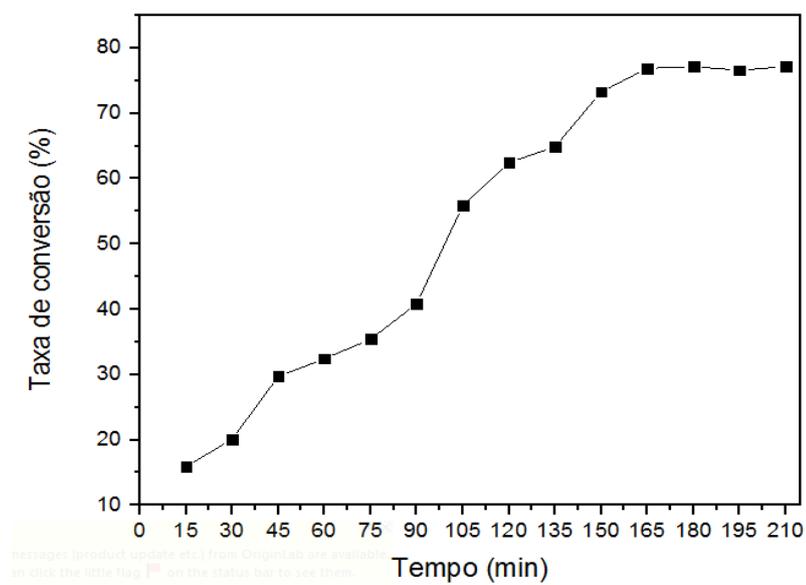


(a)



(b)

APÊNDICE B -Taxa de conversão do biocatalisador em função do tempo na síntese de oleato de decila em meio isento de solvente.



APÊNDICE C - Valores da constante de ligação associadas as diferentes temperaturas do estudo da interação entre a TLL e as NPM

Temperatura	k_b	$\ln k_b$
298,15 K	33540,33	10,42
303,15 K	35764,84	10,48
308,15 K	38494,97	10,55